



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :  C12N 15/12, C07K 14/82, C12N 15/62, 15/86, C07K 19/00, A61K 38/16, 31/70, 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/04092</b>
			(43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01111		(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIGO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 17 juillet 1996 (17.07.96)		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 95/08729 19 juillet 1995 (19.07.95) FR			
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): CONSEILLER, Emmanuel [FR/FR]; 10, rue de Plélo, F-75015 Paris (FR). BRACCO, Laurent [FR/FR]; 12, rue Moulin des Prés, F-75013 Paris (FR).			
(74) Mandataire: SAVINA, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).			

(54) Title: P53 PROTEIN VARIANTS AND THERAPEUTICAL USES THEREOF

(54) Titre: VARIANTS DE LA PROTEINE P53 ET UTILISATIONS THERAPEUTIQUES

## (57) Abstract

Proteins derived from the product of tumour suppressor gene p53 and having enhanced functions for therapeutical use are disclosed. The proteins advantageously have enhanced tumour suppressor and programmed cell death inducer functions, particularly in proliferative disease contexts where wild-type p53 protein is inactivated. Nucleic acids coding for such molecules, vectors containing same, and therapeutical uses thereof, particularly in gene therapy, are also disclosed.

## (57) Abrégé

La présente invention concerne des protéines dérivées du produit du gène suppresseur de tumeurs p53, possédant des fonctions améliorées en vue d'une utilisation thérapeutique. Elle concerne avantageusement des protéines possédant des fonctions suppresseur de tumeurs et inducteur de mort cellulaire programmée améliorées, plus particulièrement dans des contextes pathologiques de prolifération dans lesquels la protéine p53 de type sauvage est inactivée. Elle concerne également les acides nucléiques codant pour ces molécules, les vecteurs les contenant et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**VARIANTS DE LA PROTEINE P53 ET UTILISATIONS**  
**THERAPEUTIQUES**

La présente invention concerne des protéines dérivées du produit du gène suppresseur de tumeurs p53, possédant des fonctions améliorées en 5 vue d'une utilisation thérapeutique. Elle concerne avantageusement des protéines possédant des fonctions suppresseur de tumeurs et inducteur de mort cellulaire programmée supérieures à celle de la protéine p53 de type sauvage, plus particulièrement dans des contextes pathologiques de prolifération dans lesquels la protéine p53 de type sauvage est inactivée. 10 Elle concerne également les acides nucléiques codant pour ces molécules, les vecteurs les contenant et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique. Les produits de l'invention sont particulièrement adaptés à la restauration des fonctions de p53 dans des contextes pathologiques tels que notamment les cancers.

15 La protéine p53 sauvage intervient dans la régulation du cycle cellulaire et dans le maintien de l'intégrité du génome de la cellule. Cette protéine, dont la fonction principale est d'être un activateur de la transcription de certains gènes, est susceptible, par un processus non encore bien défini, de bloquer la cellule en phase G1 du cycle cellulaire lors de l'apparition de 20 mutations au cours de la réplication du génome, et d'enclencher un certains nombre de processus de réparation de l'ADN. De plus, en cas de mauvais fonctionnement de ces processus de réparation ou en cas d'apparition d'événements mutationnels trop nombreux pour être corrigés, cette protéine est capable d'induire le phénomène de mort cellulaire programmée, appelé 25 apoptose.

De cette façon, la protéine p53 agit comme un suppresseur de tumeur, en éliminant les cellules anormalement différenciées ou dont le génome a été endommagé.

Cette principale fonction de la p53 dépend de sa fonction de facteur de transcription, soit en d'autres termes de sa double capacité à reconnaître des séquences spécifiques au niveau de l'ADN génomique et à recruter la machinerie générale de transcription.

5 La protéine p53 comporte 393 acides aminés, qui définissent 5 domaines fonctionnels (voir Figure 1) :

10 - le domaine activateur de la transcription, constitué par les acides aminés 1 à 73, capable de lier certains facteurs de la machinerie générale de transcription comme la protéine TBP. Ce domaine est aussi le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles. Il est également le siège d'interactions nombreuses de la protéine p53 avec de nombreuses autres protéines et notamment avec la protéine cellulaire mdm2 ou la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr (EBV), capables de bloquer la fonction de la protéine sauvage. De plus, ce domaine possède des 15 séquences d'acides aminés dites PEST de susceptibilité à la dégradation protéolytique.

20 - le domaine de liaison à l'ADN, localisé entre les acides aminés 73 et 315. La conformation de ce domaine central de p53 régule la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques de la protéine p53. Ce domaine est le siège de deux types d'altérations affectant la fonction de la protéine sauvage :

25 (i) l'interaction avec des protéines bloquant la fonction de la p53 comme l'antigène 'grand T' du virus SV40 ou les protéines virales E6 des virus HPV16 et HPV18 capables de provoquer sa dégradation par le système de l'ubiquitine. Cette dernière interaction ne peut se faire qu'en présence de la protéine cellulaire E6ap (enzyme E3 de la cascade de l'ubiquitination).

(ii) les mutations ponctuelles qui affectent la fonction de la p53 et dont la quasi-totalité sont localisées dans cette région.

- le signal de localisation nucléaire, constitué des acides aminés 315 à 325, indispensable au bon adressage de la protéine dans le compartiment où elle va exercer sa principale fonction.

5 - le domaine d'oligomérisation, constitué des acides aminés 325 à 355. Cette région 325 à 355 forme une structure de type; feuillet  $\beta$  (326-334)-coude (335-336)-hélice  $\alpha$  (337-355). Les altérations de fonctions localisées dans cette région sont essentiellement dues à l'interaction de la protéine sauvage avec les différentes formes mutantes qui peuvent conduire à des effets variables sur la fonction de la protéine sauvage.

10 - le domaine de régulation, constitué des acides aminés 365 à 393, qui est le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations, fixation d'ARN,...) qui modulent la fonction de la protéine p53 de façon positive ou négative. Ce domaine joue un rôle extrêmement important dans la modulation de l'activité 15 de la protéine sauvage.

Le fonctionnement de la protéine p53 peut être perturbé de différentes façons.

20 - blocage de sa fonction par un certain nombre de facteurs comme par exemple l'antigène 'grand T' du virus SV40, la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr, ou la protéine cellulaire mdm2.

25 - déstabilisation de la protéine par augmentation de sa susceptibilité à la protéolyse, notamment par interaction avec la protéine E6 des virus du papillome humain HPV16 et HPV18, qui favorise l'entrée de la p53 dans le cycle d'ubiquitination. Dans ce cas l'interaction entre ces deux protéines ne peut se faire que par la fixation préalable d'une protéine cellulaire, la protéine E6ap dont le site de fixation est mal connu.

- mutations ponctuelles au niveau du gène de la p53.

- délétion d'un ou des deux allèles de la p53

Les deux derniers types de modifications sont retrouvés dans environ 50% des différents types de cancer. A cet égard, les mutations du gène de la p53 repertoriées dans les cellules cancéreuses touchent une très grande 5 partie du gène codant pour cette protéine, et ont pour résultats des modifications variables du fonctionnement de cette protéine. On peut cependant noter que ces mutations sont en grande majorité localisées dans la partie centrale de la protéine p53 dont on sait qu'elle est la région de contact avec les séquences génomiques spécifiques de la protéine p53.

10 Ceci explique pourquoi la plupart des mutants de la protéine p53 ont comme principale caractéristique de ne plus pouvoir se fixer aux séquences d'ADN que reconnaît la protéine sauvage et ainsi de ne plus pouvoir exercer leur rôle de facteur de transcription. Par ailleurs, certains mutants semblent avoir acquis de nouvelles fonctions telles que l'activation de certains gènes 15 au niveau transcriptionnel.

On regroupe actuellement l'ensemble de ces modifications dans trois catégories:

- les mutants dits faibles, dont le produit est une protéine non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles, 20 n'affecte pas le fonctionnement de la protéine sauvage codée par l'autre allèle. Les principaux représentants de cette catégorie sont les mutants H273 et W248, ce dernier étant spécifique du syndrome familial de Li-Fraumeni d'hypersensibilité aux affections cancéreuses.

- les mutants dominant-négatifs, dont le produit est une protéine 25 non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles et par interaction avec la protéine sauvage, est capable de bloquer le fonctionnement de celle-ci par formation d'oligomères mixtes non-actifs qui

ne peuvent plus se fixer aux séquences d'ADN spécifiques de la protéine sauvage. Le principal représentant de cette catégorie est le mutant G281.

- les mutants dominant-oncogéniques, dont le produit est une protéine qui est capable d'une part de bloquer la fonction de la protéine sauvage comme les mutants de la catégorie précédente, et d'autre part, de favoriser par des mécanismes mal connus le développement tumoral, présentant ainsi un gain de fonction. Le principal représentant de cette catégorie est le mutant H175.

Compte tenu de ses propriétés anti-tumorales et apoptotiques et de son implication dans nombreuses pathologies de type hyperprolifératives, le 10 gène p53 sauvage a été utilisé dans des approches de thérapie génique et cellulaire. Il a en particulier été proposé de traiter certaines pathologies hyperprolifératives, et notamment des cancers, par administration *in vivo* du gène p53 sauvage, par restauration des fonctions de p53. L'administration 15 peut être réalisée préférentiellement par des vecteurs viraux et notamment adénoviraux (WO94/24297) ou rétroviraux (WO94/06910).

Il a ainsi été montré que l'introduction d'un acide nucléique codant pour la protéine p53 sauvage permettait de restaurer partiellement une régulation normale de la croissance cellulaire. Cependant, si ces résultats 20 sont encourageants, l'efficacité de ces approches est limitée par l'efficacité thérapeutique de la protéine p53 après transfert et expression *in vivo* dans les cellules hyperprolifératives. En effet, les situations pathologiques hyperprolifératives telles que les cancers proviennent du dérèglement de l'équilibre qui s'établit dans un réseau de contrôles négatifs et positifs de la 25 croissance cellulaire. L'inactivation du contrôle négatif exercé par la protéine p53 sauvage par l'apparition d'un mutant p53 dominant négatif à partir de l'un des deux allèles, la surexpression d'un partenaire cellulaire inactivant p53 comme par exemple mdm2, voir la présence d'un inactivateur viral suite à une infection, constituent un contexte non favorable pour une thérapie

basée sur la réintroduction d'une protéine p53 sauvage qui risque fort d'être également inactivée.

Il est donc particulièrement important de pouvoir disposer de protéines de type p53 ayant des propriétés thérapeutiques accrues. Notamment, il 5 serait particulièrement avantageux de disposer de molécules p53 actives constitutivement et non sensibles aux effets inactivateurs des mutants dominant-négatifs et oncogéniques ou d'autres protéines cellulaires ou virales telles que E6 de HPV18 et HPV16, MDM2, EBNA5 de EBV, etc rencontrés dans les cellules tumorales.

10 Certaines modifications de la protéine p53 ont été décrites dans l'art antérieur. Ainsi, la demande WO95/06661 décrit des modifications sur certains résidus des régions homologues de la protéine p53, c'est-à-dire dans les régions 343-351, 372-380 et 381-393. Cependant, ces modifications sont très mineures et ne permettent pas aux produits résultant d'échapper 15 aux mécanismes d'inactivation de la protéine p53 *in vivo*. De plus, ces protéines ne semblent pas présenter d'activité améliorée par rapport à la protéine p53 sauvage.

Hupp et al. (Cell Vol 71 (1992) 875) ont décrit un dérivé de p53 comprenant une délétion des 30 résidus C-terminaux (p53 $\Delta$ C-ter30). 20 Toutefois, si cette protéine conserve une capacité à lier l'ADN, ses propriétés apoptotiques ne sont pas démontrées. De plus, elle n'est pas résistante à l'inactivation par les mutants dominants négatifs.

Pietenpol et al (PNAS 91 (1994) 1998) ont décrit des molécules chimériques dérivées de la protéine p53, notamment une protéine VP16-p53 25 (80-343)-GCN4. Cependant, cette molécule possède une capacité de liaison à l'ADN et de transactivation nettement diminuées par rapport à la protéine p53 sauvage (40%). Par ailleurs, elle possède une région d'oligomérisation non sélective, risquant d'interagir avec d'autres composants cellulaires et ainsi

d'induire une réponse cellulaire non spécifique. Par ailleurs, ses propriétés de résistance aux mécanismes d'inactivation ne sont pas indiquées.

La présente invention décrit de nouveaux variants de la protéine p53 présentant des propriétés thérapeutiques améliorées. Elle décrit en 5 particulier des variants adaptés à une utilisation en thérapie génique, notamment anti-cancéreuse. Les variants de l'invention dérivent de la protéine p53 par modification(s) structurale(s), conservent une activité de type p53 et, exprimés dans des cellules hyperprolifératives, présentent au moins une propriété accrue par rapport à la protéine p53. Il peut s'agir en 10 particulier de l'activité anti-proliférative et/ou apoptotique. Les variants de l'invention possèdent avantageusement une activité anti-proliférative et/ou apoptotique accrue, ou plus spécifique des cellules hyperprolifératives, ou moins sensible aux différentes altérations auxquelles est sujette la p53 sauvage.

15 Un premier objet de l'invention concerne plus particulièrement un variant de la protéine p53 dans lequel tout ou partie du domaine d'oligomérisation est déleté et remplacé par un domaine leucine zipper artificiel. Comme indiqué ci-avant, la protéine p53 est inactivée par certains mutants, et notamment les mutants dominant-négatifs et oncogéniques, 20 rencontrés dans les cellules tumorales. Cette inactivation est le résultat de la formation d'oligomères mixtes non actifs entre la protéine p53 sauvage et le mutant, qui ne peuvent plus se fixer aux séquences spécifiques reconnues par la protéine p53 sauvage. La présente invention décrit maintenant des variants de la protéine p53 résistant à l'effet dominant négatif de certains 25 mutants, c'est-à-dire des variants actifs dans un contexte cellulaire présentant un ou deux allèles mutés, ce qui est le cas de près de 90% des cancers humains p53 dépendants.

Dans les variants selon l'invention, tout ou partie du domaine d'oligomérisation naturel de la protéine, qui ne fait pas la distinction entre les

formes sauvage et mutante, est ainsi remplacé par un domaine équivalent possédant une capacité d'oligomérisation spécifique. Cette modification est effectuée en utilisant un leucine-zipper artificiel optimisé pour former un dimère. Les molécules selon l'invention comportant un tel leucine-zipper 5 artificiel sont particulièrement avantageuses car forment des oligomères uniquement avec d'autres molécules portant le même leucine-zipper. Elles ne forment donc pas d'oligomères avec les mutants dominant négatifs ou oncogéniques de la protéine p53, susceptibles de les inactiver. Elles ne forment pas non plus d'oligomères avec d'autres protéines cellulaires portant 10 des domaines d'oligomérisation, susceptibles également de les inactiver ou d'induire des effets indésirables. Elles ne peuvent former que des homooligomères et possèdent donc une sélectivité importante, assurant une meilleure activité dans un contexte de pathologie hyperproliférative.

15 Selon la présente invention, le domaine leucine zipper artificiel est donc avantageusement un domaine non présent à l'état naturel, assurant une sélectivité d'oligomérisation. Tout préférentiellement, le domaine d'oligomérisation est représenté par la séquence SEQ ID n° 1.

20 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les variants comportent une délétion de tout ou partie du domaine d'oligomérisation et de tout ou partie du domaine de régulation. Comme indiqué précédemment, le domaine d'oligomérisation est localisé entre les résidus 325-355 inclus et le domaine de régulation entre les résidus 365-393 inclus. Ce type de variant est tout à fait avantageux car est dépourvu de tout ou partie des effets de régulation négative exercée par l'intermédiaire de la partie C-terminale (aa 25 365-393). Ces variants constituent des protéines potentiellement constitutivement actives, présentant une activité non modulable et éventuellement accrue. La région de régulation est avantageusement supprimée dans sa totalité. Les variants préférés selon l'invention comportent une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 30 326 ou 337 inclus.

Des exemples d'intermédiaires utilisés pour la construction de ces variants sont notamment :

5 . pEC107 (75-325-1z) possédant une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1.

. pEC110 (75-336-1z) possédant une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1.

10 Selon un mode de réalisation avantageux, dans les variants de l'invention, le résidu cystéine en position 182 de la protéine p53 est remplacé par une histidine. Cette mutation permet avantageusement d'augmenter l'affinité du variant pour les séquences nucléotidiques spécifiques de liaison. L'introduction de cette modification supplémentaire permet donc d'obtenir une molécule ayant en plus un potentiel transactivateur augmenté.

15 Des exemples précis de constructions intermédiaires pour la préparation de variants selon l'invention combinant ces différentes modifications sont notamment :

20 pEC139 (75-325(H182)-1z) possédant une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1, et une histidine en position 182.

25 pEC140 (75-336(H182)-1z) possédant une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1, et une histidine en position 182.

Avantageusement, dans les variants selon l'invention, tout ou partie du domaine transactivateur est également déleté et remplacé par un domaine

transactivateur hétérologue. Il a été indiqué ci-avant que les fonctions transactivatrices de p53 sont essentielles à son activité de suppresseur de tumeur ou d'inducteur d'apoptose. De manière à augmenter le potentiel thérapeutique des variants selon l'invention, il est particulièrement 5 avantageux de substituer le domaine transactivateur naturel par un domaine transactivateur hétérologue puissant. Ces variants présentent ainsi de nombreux avantages. Ils possèdent bien entendu une activité transactivateur élevée. Mais ils sont également rendus insensibles aux effets de régulation négative exercés par l'intermédiaire de la partie N-terminale (aa 1-73). En 10 effet cette région contient les séquence PEST responsables de sa dégradation protéolytique. La substitution de cette région par un domaine transactivateur hétérologue dépourvu de séquences PEST permet de diminuer cette régulation négative. Ces variants sont également caractérisés par la diminution, voire la suppression, de toute interaction avec la protéine 15 E6 du virus du papillome humain (HPV) qui est susceptible d'induire leur dégradation. Ils sont également moins sensibles aux interactions avec d'autres protéines cellulaires telles que MDM2 et EBNA qui affectent l'activité de la protéine p53 sauvage. Les variants ainsi obtenus possèdent donc une stabilité accrue. La suppression des domaines sensibles à une régulation 20 négative (domaines régulateur et transactivateur) conduit de manière particulièrement avantageuse à des molécules qui ne sont plus la cible de protéines induisant leur protéolyse ou leur inactivation.

Avantageusement, dans les variants de l'invention, le domaine transactivateur est supprimé par délétion des résidus 1 à 74. Les 25 constructions intermédiaires utilisées pour la réalisation de telles molécules sont notamment pEC107 (75-325-lz), pEC110 (75-336-lz), pEC139 (75-325(H182)-lz) et pEC140 (75-336(H182)-lz).

Selon un premier mode de réalisation, le domaine transactivateur hétérologue est le domaine transactivateur de VP16. Il est avantageusement 30 constitué des résidus 411 à 490 de VP16, dont la séquence est donnée

SEQ ID n° 2. Des exemples précis de variants selon l'invention combinant ces différents modifications sont notamment :

5 ⇒ pEC114 (VP16-75-325-1z) possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2 et une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1. La séquence complète du variant pEC114 est représentée SEQ ID n° 25.

10 ⇒ pEC116 (VP16-75-336-1z) possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2 et une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1. La séquence complète du variant pEC116 est représentée SEQ ID n° 26.

15 ⇒ pEC147 (VP16-75-325(H182)-Iz) possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2; une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ 20 ID n°1, et une histidine en position 182.

⇒ pEC149 (VP16-75-336(H182)-Iz) possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2; une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1, et une histidine en position 182.

En raison des modifications mentionnées ci-avant, les variants de l'invention ont également des propriétés 'tueuses' que sont l'arrêt du cycle

cellulaire et l'apoptose potentiellement améliorées. La combinaison des modification mentionnées, incluant la présence d'un domaine d'oligomérisation sélectif et un pouvoir transactivateur amélioré par substitution du domaine d'origine et par la présence d'une histidine en 182 5 confèrent en effet aux variants de l'invention des potentialités thérapeutiques nettement améliorées. En outre, les variants selon l'invention permettent d'éviter l'apparition de certains mutants (dominants oncogéniques). Les gains de fonction de certains mutants de p53 sont encore mal définis tant au niveau de leur mécanismes qu'au niveau des domaines de la protéine p53 10 impliqués. Il est fort probable que certaines de ces nouvelles fonctions vont dépendre de l'association à certains partenaires cellulaires effecteurs. L'élimination des domaines impliqués dans ces interactions, et dont les propriétés transformantes ont été mises en évidence, au sein des molécules décrites dans la présente demande sont de nature à empêcher l'apparition 15 de ces gains de fonctions oncogéniques. Ainsi les mutations qui apparaîtraient de façon aléatoire lors de la préparation des lots cliniques de plasmides codant pour les polypeptides décrits ou lors de la production de lots cliniques de vecteurs viraux ou chimiques codant pour ces mêmes polypeptides ne créeraient pas une sous-population de molécules 20 oncogéniques.

Par ailleurs, en raison de la suppression de certains domaines de p53 indispensables pour la fixation de certaines molécules inhibitrices de sa fonction, les variants de l'invention présentent également une activité thérapeutique plus élevée et plus stable. Finalement, l'existence de motifs 25 étrangers dans les différentes constructions de l'invention (protéine AS murine par exemple, domaine d'oligomérisation artificiel, etc) est susceptible de déclencher une réaction immunitaire lors de la mort des cellules transfectées et du relargage dans le milieu extracellulaire des ces différents fragments, augmentant ainsi la capacité du système immunitaire à lutter 30 contre les cellules tumorales.

Selon un autre mode de réalisation, le domaine transactivateur hétérologue est un domaine transactivateur actif préférentiellement dans les cellules transformées et non dans les cellules saines avoisinantes. La présente invention décrit en effet également des molécules dont la fonction 5 s'exerce essentiellement dans des cellules transformées et non dans les cellules saines avoisinantes. Bien qu'il semble que l'expression exogène d'une p53 sauvage au sein d'une cellule différenciée comportant de la p53 sauvage endogène ait peu ou pas d'effet sur la viabilité, il est néanmoins avantageux de pouvoir disposer d'une protéine qui ne serait fonctionnelle 10 qu'au sein de la cellule ciblée. Cette spécificité de la cellule tumorale versus la cellule normale est actuellement beaucoup travaillée au niveau de la spécificité du ciblage du vecteur viral ou de la conception de systèmes d'expression spécifiques. La présente invention décrit maintenant des dérivés de p53 dont un des domaines fonctionnels est éteint en l'absence 15 d'un activateur cellulaire présent essentiellement dans les cellules transformées.

Ainsi, un autre objet de l'invention concerne un variant de la protéine p53 actif préférentiellement dans les cellules transformées, dans lequel un au moins des domaines fonctionnels de p53 est déleté en tout ou en partie et 20 est substitué par un domaine hétérologue actif préférentiellement dans les cellules transformées. Préférentiellement, le domaine fonctionnel de p53 concerné est le domaine transactivateur. Ainsi, un objet particulièrement préféré de l'invention concerne un variant de la protéine p53 actif préférentiellement dans les cellules transformées, dans lequel le domaine 25 transactivateur naturel est déleté en tout ou en partie et est substitué par un domaine transactivateur actif préférentiellement dans les cellules transformées. Avantageusement, le domaine transactivateur naturel est déleté par suppression des résidus 1-74 inclus de p53.

L'invention concerne plus particulièrement des variants de p53 qui 30 sont fonctionnels spécifiquement en présence d'une protéine Ras

oncogénique ou d'un mutant de p53. Ces molécules sont obtenues notamment par remplacement du domaine transactivateur de la protéine p53 sauvage par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule 5 transformée.

Le domaine protéique capable de lier spécifiquement le transactivateur transcriptionnel ou le complexe transactivateur transcriptionnel présent dans les molécules de l'invention peut être de différents types. Il peut s'agir en particulier d'un domaine d'oligomérisation 10 dans le cas où le transactivateur ou le complexe transactivateur ciblé comporte également un tel domaine. Il peut également s'agir de tout domaine synthétique ou naturel connu pour interagir avec ledit transactivateur ou complexe transactivateur. Il peut encore s'agir d'un anticorps ou d'un fragment ou dérivé d'un anticorps dirigé contre le transactivateur ou 15 complexe transactivateur.

Avantageusement, le domaine hétérologue est constitué par un anticorps ou un fragment ou dérivé d'anticorps. Les fragments ou dérivés d'anticorps sont par exemple les fragments Fab ou F(ab)'2, les régions VH ou VL d'un anticorps ou encore des anticorps simple chaîne (ScFv) 20 comprenant une région VH liée à une région VL par un bras. La construction de séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps modifiés selon l'invention a été décrite par exemple dans le brevet US4,946,778 ou dans les demandes WO94/02610, WO94/29446.

Une construction préférée selon la présente invention comprend un 25 ScFv dirigé contre un mutant de la protéine p53. Ces mutants apparaissent dans les cellules transformées et possèdent un domaine transactivateur. Leur recrutement par un variant selon l'invention crée une molécule chimère active sélectivement dans les cellules transformées.

Selon un autre mode préféré, le ScFv est dirigé contre un complexe transactivateur, c'est à dire un complexe entre une molécule cible présente sélectivement dans les cellules transformées, mais dépourvue d'activité transactivateur transcriptionnel (par exemple un ras oncogénique), et une 5 molécule portant un domaine transactivateur. Cette dernière comporte avantageusement un domaine transactivateur et un domaine de liaison sélectif à ladite molécule cellulaire (par exemple un ScFv anti-ras). La fixation de cette molécule permet la formation d'un complexe binaire transactivateur transcriptionnel, lequel complexe étant alors recruté par le 10 variant de l'invention.

Tout autre type de modification conduisant à cette spécificité d'activité peut bien entendu être utilisée dans le cadre de la présente invention, telle que notamment tout domaine transactivateur spécifique d'un type de cellule.

Ces variants sélectifs comportent avantageusement des modifications 15 supplémentaires dans la partie C-terminale comme indiqué ci-avant pour améliorer encore leurs propriétés. Ainsi, ils comportent avantageusement une délétion de tout ou partie du domaine d'oligomérisation, qui peut être remplacé par tout domaine d'oligomérisation hétérologue. Il s'agit plus préférentiellement d'un domaine d'oligomérisation artificiel, tel que défini ci- 20 avant.

Des exemples précis de variants selon l'invention actifs préférentiellement dans les cellules transformées sont notamment :

ScFv.antip53\*-75-325-1z, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un 25 domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine p53 présent dans une cellule transformée, et une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 326, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1.

ScFv.antip53\*-75-325(H182)-Iz, comprenant en plus une mutation His182.

ScFv.antip53\*-75-336-Iz, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un 5 domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine p53 présent dans une cellule transformée, et une délétion de la partie C-terminale de la protéine p53, à partir du résidu 337, substituée par un domaine d'oligomérisation artificiel de séquence SEQ ID n°1.

ScFv.antip53\*-75-336(H182)-Iz, comprenant en plus une mutation 10 His182.

- ScFv.antip53\*-75-393, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine p53 présent dans une cellule transformée.

15 - ScFv.antip53\*-75-393(H182), comprenant en plus une histidine en position 182.

- ScFv.antip53\*-75-367, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine 20 p53 présent dans une cellule transformée; et une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 368.

- ScFv.antip53\*-75-367(H182), comprenant en plus une histidine en position 182,

- ScFv.antip53\*-75-AS, possédant une délétion de la partie N-terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par un domaine protéique capable de lier spécifiquement un mutant de la protéine 25 p53 présent dans une cellule transformée; et une délétion de la partie C-

terminale, à partir du résidu 367, additionnée des 19 acides aminés de séquence SEQ ID n° 3.

- ScFv.antip53\*-75-AS(H182), comprenant en plus une histidine en position 182,

5 En outre, le terme actif préférentiellement indique que ces variants exercent leur activité essentiellement lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules transformées. Une activité résiduelle peut toutefois exister dans les cellules non transformées, mais inférieure à celle observée dans les cellules transformées.

10 Un autre objet de la présente invention concerne un variant de la protéine p53 comprenant une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 367, fusionné à la séquence SEQ ID n° 3 (AS). Cette séquence correspond aux 19 derniers acides aminés du produit d'épissage alternatif de la protéine p53 murine. Ce variant présente donc une modification du 15 domaine d'oligomérisation basée sur une protéine décrite chez la souris comme un variant d'épissage alternatif de la protéine sauvage dans laquelle les 27 acides aminés C-terminaux sont remplacés par 19 acides aminés différents. Ce variant possède une affinité pour les séquences spécifique de liaison à l'ADN potentiellement accrue.

20 Ce variant comporte avantageusement des modification dans la partie N-terminale comme indiqué ci-avant pour améliorer encore ses propriétés. Ainsi, il comporte avantageusement une délétion de tout ou partie du domaine transactivateur, qui peut être remplacé par tout domaine transactivateur hétérologue. Il s'agit plus préférentiellement du domaine transactivateur dérivé de la protéine VP16 ou d'un domaine protéique capable de lier spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée. En outre, le résidu 182 25 de la protéine p53 est avantageusement remplacé par une histidine.

Des exemples précis de ce type de variants selon l'invention sont notamment :

- . ScFv.antip53\*-75-AS, décrit ci-avant,
- . pEC143 (VP16-75-AS), possédant une délétion de la partie N-5 terminale de la protéine p53 comprenant les résidus 1-74, substituée par le domaine transactivateur de VP16 de séquence SEQ ID n° 2; et une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 367, additionnée des 19 acides aminés de séquence SEQ ID n° 3. La séquence complète du variant pEC143 est représentée SEQ ID n° 28.
- 10 . ScFv.antip53\*-75-AS(H182), décrit ci-avant,
- . pEC153 (VP16-75-AS(H182)), correspond à pEC143 avec une histidine en position 182.

Selon une manière plus générale, l'invention concerne toute protéine chimère comprenant un domaine transactivateur, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine d'adressage au noyau et un domaine d'oligomérisation, dans laquelle les domaines de liaison à l'ADN et d'adressage au noyau sont constitués par les acides aminés 75 à 325 de la protéine p53 sauvage humaine (SEQ ID n° 4). La demanderesse a en effet montré que cette région de la protéine p53, couplée à des domaines transactivateur et 15 d'oligomérisation appropriés, permet la création de molécules de type p53 ayant des propriétés particulièrement avantageuses en terme de stabilité, de résistance aux effets négatifs des mutants de p53 et de sensibilité à 20 l'inactivation par certains facteurs cellulaires.

Selon une variante, les domaines de liaison à l'ADN et d'adressage au 25 noyau sont constitués par les acides aminés 75 à 336 de la protéine p53 sauvage humaine (SEQ ID n° 5).

Les protéines chimères selon l'invention peuvent comporter différents types de domaines transactivateur. Il peut s'agir du domaine transactivateur de la protéine p53. Préférentiellement, il s'agit d'un domaine transactivateur hétérologue, choisi par exemple parmi le domaine transactivateur de VP16 5 ou un domaine protéique capable de lier spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.

Concernant le domaine d'oligomérisation, il s'agit préférentiellement d'un domaine artificiel, et donc spécifique, tel que par exemple un leucine zipper artificiel, en particulier de séquence SEQ ID n° 1.

10 Les protéines chimères selon l'invention peuvent en outre comporter un résidu histidine en position 182.

Des exemples précis de protéines chimères telles que décrites dans la présente demande sont notamment pEC114, pEC116, pEC147 et pEC149.

15 La présente invention a également pour objet tout acide nucléique codant pour un variant ou une protéine chimère tel que défini ci-avant.

L'acide nucléique selon l'invention peut être un acide ribonucléique (ARN) ou désoxyribonucléique (ADN). En outre, il peut s'agir d'un ADN complémentaire (ADNc) éventuellement comprenant un ou plusieurs introns du gène p53. Il peut être d'origine humaine, animale, virale, 20 synthétique ou semi-synthétique. Il peut être obtenu de différentes manières et notamment par synthèse chimique en utilisant les séquences présentées dans la demande et par exemple un synthétiseur d'acides nucléiques. Il peut également être obtenu par criblage de banques au moyen de sondes spécifiques, notamment telles que décrites dans la demande. Il peut encore être obtenu par des techniques mixtes incluant la 25 modification chimique (élongation, délétion, substitution, etc) de séquences criblées à partir de banques. D'une manière générale, les

acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés selon toute technique connue de l'homme du métier.

Préférentiellement, l'acide nucléique selon l'invention est un ADNc ou un ARN.

5 L'acide nucléique selon l'invention est avantageusement choisi parmi :

(a) tout ou partie des séquences SEQ ID n° 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33 et 34 ou de leur brin complémentaire,

10 (b) toute séquence hybridant avec les séquences (a) et codant pour un dérivé selon l'invention,

(c) les variants de (a) et (b) résultant de la dégénérescence du code génétique.

Comme indiqué précédemment, la demanderesse a maintenant construit de nouvelles séquences d'acide nucléique codant pour des 15 polypeptides variants de p53, ayant des propriétés antiprolifératives et apoptotiques tout à fait remarquables. Ces acides nucléiques peuvent être utilisés comme agents thérapeutiques pour produire dans les cellules des dérivés selon l'invention capables de détruire ou de corriger des dysfonctionnements cellulaires. A cet effet, la présente invention concerne 20 également toute cassette d'expression comprenant un acide nucléique tel que défini ci-avant, un promoteur permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription. Le promoteur est avantageusement choisi parmi les promoteurs fonctionnels dans les cellules mammifères, de préférence humaines. Plus préférentiellement, il s'agit d'un promoteur 25 permettant l'expression d'un acide nucléique dans une cellule hyperproliférative (cancéreuse, resténose, etc). A cet égard, différents promoteurs peuvent être utilisés. Il peut s'agir par exemple du propre

promoteur du gène p53. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Il peut ainsi s'agir de tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou 5 non, inductible ou non, forte ou faible. On peut citer notamment les séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, a-actine, 10 tubuline, etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoAI, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison 15 des acides gras, a-actine du muscle lisse, etc) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc). De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore 20 le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

La présente invention fournit maintenant de nouveaux agents thérapeutiques permettant, par leurs propriétés antiprolifératives et/ou 25 apoptotiques d'interférer avec de nombreux dysfonctionnements cellulaires. Dans ce but, les acides nucléiques ou cassettes selon l'invention peuvent être injectés tels quels au niveau du site à traiter, ou incubés directement avec les cellules à détruire ou traiter. Il a en effet été décrit que les acides nucléiques nus pouvaient pénétrer dans les cellules 30 sans vecteur particulier. Néanmoins, on préfère dans le cadre de la

présente invention utiliser un vecteur d'administration, permettant d'améliorer (i) l'efficacité de la pénétration cellulaire, (ii) le ciblage (iii) la stabilité extra- et intracellulaires.

Dans un mode de mise en oeuvre particulièrement préféré de la 5 présente invention l'acide nucléique ou la cassette est incorporé dans un vecteur. Le vecteur utilisé peut être d'origine chimique (liposome, nanoparticule, complexe peptidique, lipides ou polymères cationiques, etc) virale (rétrovirus, Adénovirus, virus de l'herpès, AAV, virus de la vaccine, etc) ou plasmidique.

10 L'utilisation de vecteurs viraux repose sur les propriétés naturelles de transfection des virus. Il est ainsi possible d'utiliser par exemple les adénovirus, les herpès virus, les rétrovirus et les virus adéno associés. Ces vecteurs s'avèrent particulièrement performants sur le plan de la transfection. A cet égard, un objet préféré selon l'invention réside dans un 15 rétrovirus recombinant défectif dont le génome comprend un acide nucléique tel que défini ci-avant. Un autre objet particulier de l'invention réside dans un adénovirus recombinant défectif dont le génome comprend un acide nucléique tel que défini ci-avant.

20 Le vecteur selon l'invention peut également être un agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes. Les vecteurs chimiques ou biochimiques, synthétiques ou naturels, représentent une alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui concerne la taille de 25 l'ADN à transfacter. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transfacter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la

nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques.

L'acide nucléique ou le vecteur utilisé dans la présente invention peut être formulé en vue d'administrations par voie topique, orale, 5 parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, l'acide nucléique ou le vecteur est utilisé sous une forme injectable. Il peut donc être mélangé à tout véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau du site à traiter. 10 Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Une injection directe de l'acide nucléique dans la tumeur du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet 15 thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses d'acide nucléique utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du gène, du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée.

20 L'invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins un acide nucléique tel que défini ci-avant.

Elle concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur tel que défini ci-avant.

25 Elle concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant au moins un variant de p53 tel que défini ci-avant.

En raison de leurs propriétés antiprolifératives, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont tout particulièrement adaptées pour le traitement des désordres hyperprolifératifs, tels que notamment les

cancers et la resténose. La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement efficace pour la destruction de cellules, notamment de cellules hyperprolifératives. Elle peut être utilisée *in vitro* ou *ex vivo*. *Ex vivo*, elle consiste essentiellement à incuber les cellules en présence d'un 5 ou plusieurs acides nucléiques (ou d'un vecteur, ou cassette ou directement du dérivé). *In vivo*, elle consiste à administrer à l'organisme une quantité active d'un vecteur (ou d'une cassette) selon l'invention, de préférence directement au niveau du site à traiter (tumeur notamment). A cet égard, l'invention a également pour objet une méthode de destruction 10 de cellules hyperprolifératives comprenant la mise en contact desdites cellules ou d'une partie d'entre-elles avec un acide nucléique tel que défini ci-dessus.

La présente invention est avantageusement utilisée *in vivo* pour la destruction de cellules en hyperprolifération (i.e. en prolifération 15 anormale). Elle est ainsi applicable à la destruction des cellules tumorales ou des cellules de muscle lisse de la paroi vasculaire (resténose). Elle est tout particulièrement appropriée au traitement des cancers dans lesquels un mutant de p53 est observé. A titre d'exemple, on peut citer les adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du 20 poumon, les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphomes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers des os, de la peau, du pancréas ou encore les cancers du rein et de la prostate, les 25 cancers de l'oesophage, les cancers du larynx, les cancers tête et cou, les cancers ano-génitaux HPV positifs, les cancers du nasopharynx EBV positifs, les cancers dans lesquels la protéine cellulaire mdm2 est surexprimée, etc.

Les variants de l'invention sont particulièrement efficaces pour le 30 traitement des cancers dans lesquels la protéine MDM2 est en outre

surexprimée, ainsi que des cancers liés au virus HPV tels que les cancers ano-génitaux HPV positifs.

La présente invention est décrite plus en détail dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5            **Légende des Figures**

Figure 1 : Domaines fonctionnels de la protéine p53 sauvage. TA : Domaine activateur de la transcription; DNB : domaine de liaison à l'ADN; NLS : signal de localisation nucléaire; OL : domaine d'oligomérisation; REG : domaine de régulation.

10            Figure 2 : Construction d'un ADNc codant pour la forme AS de la p53.

Figure 3 : Clonage des ADNc codant pour les constructions pEC104, pEC106, pEC131, pEC132 et pEC133 et pour leur variant H182.

Figure 4 : Construction des variants pEC107, pEC110, pEC139 et pEC140 par fusion avec le domaine d'oligomérisation artificiel.

15            Figure 5 : Construction des variants pEC114, pEC116, pEC141, pEC143, pEC145, pEC147, pEC149, pEC151, pEC153 et pEC155.

Figure 6 : Reconnaissance de séquences d'ADN double brin spécifiques par les molécules hybrides de l'invention.

Expérience de retard sur gel: compétition entre HisV325 et p53 sauvage.  
20            colonne 1: incubation en l'absence de HisV325 et p53 sauvage, colonne 2: 30 ng p53 sauvage, colonne 3: idem 2 + pAb421, colonne 4: 30 ng HisV325, colonne 5: idem 4 + pAb421, colonne 6: 30 ng HisV325 + 30 ng p53 sauvage, colonne 7: idem 6 + pAb421, colonne 8: 30 ng HisV325 + 15 ng p53 sauvage, colonne 9: idem 8 + pAb421, colonne 10: 30 ng HisV325 + 7.5  
25            ng p53 sauvage, colonne 11: idem 10 + pAb421, colonne 12: 30 ng HisV325

+ 4.5 ng p53 sauvage, colonne 13: idem 12 + pAb421, colonne 14: 30 ng HisV325 + 3 ng p53 sauvage, colonne 15: idem 14 + pAb421

Figure 7 : Activité transactivatrice de la protéine p53 sauvage et des variants AS, V-325 et V-336.

5 Figure 8 : Activité transactivatrice de la protéine p53 sauvage et des variants V-325, V-336 et V-343.

Figure 9 : Expression des variants de l'invention dans les cellules SAOS-2

10 Figure 10 : Induction des gènes hdm2 et WAF1 dans les cellules EB, EB-1 et EB-V325

Figure 11 : Effet de la protéine E6 sur la fonction transactivatrice de la protéine p53 et des variants de l'invention dans les cellules SAOS-2. Quantité des vecteurs CMV-construction = 100ng

15 Figure 12 : Effet de la protéine E6 sur la fonction transactivatrice de la protéine p53 et des variants de l'invention dans les cellules HeLa.

Figure 13: Sensibilité de la protéine p53 sauvage et des variants de l'invention à la dégradation induite par la protéine E6.

20 Figure 14 : Effet du mutant dominant-négatif de p53 H175 sur la fonction transactivatrice des variants de l'invention. Quantité des vecteurs CMV-construction = 100ng

Figure 15 : Effet de la protéine hdm2 sur la fonction transactivatrice de la protéine p53 et des variants de l'invention dans les cellules SAOS-2. Quantité des vecteurs CMV-construction = 100ng

25 Figure 16 : Effet des protéines p53 sauvage et V-325 sur la croissance de cellules surexprimant la protéine hdm2.

Figure 17 : Induction de l'apoptose par les protéines p53 sauvage et V-325.

Figure 18 : Cinétique d'induction de l'apoptose dans les cellules EB, EB-1 et EB-V325

5 **Exemples**

**Exemple A. Construction de différents fragments nucléotidiques nécessaires à la réalisation des gènes codant pour les variants de la protéine p53**

A1. Construction du cDNA codant pour la p53 sauvage humaine

10 Le gène de la p53 humaine a été cloné par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur de l'ADN d'une banque de placenta humain (Clontech) en utilisant les oligonucléotides 5'-1 et 3'-393.

Oligonucléotide 5'-1 (SEQ ID n° 6) :

ATGGAGGAGCCGCAG

15 Oligonucléotide 3'-393 (SEQ ID n° 7) :  
GGCGGCCGCGATATCGATTATCATCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC

Ce produit a ensuite été cloné directement après PCR dans le vecteur pCRII (Invitrogen).

A2 - Construction d'un ADNc codant pour la forme AS de la p53

20 La forme AS de la p53 comprend un fragment codant pour les acides aminés 1 à 366 de la protéine p53 humaine additionné des 19 derniers acides aminés du produit d'épissage alternatif de la protéine p53 murine.

La forme AS de la p53 a été obtenue en deux étapes:

- amplification par PCR d'un fragment codant pour les acides aminés 1 à 367 de la protéine p53 en utilisant les oligonucléotides 5'-1 (Cf exemple A1) et 3'-367.

Oligonucléotide 3'-367 (SEQ ID n° 8) :

5 GGC GGCC GCG ATAT CGATT CAT CAG CTC GAG TGAGC

Le fragment PCR ainsi obtenu a ensuite été cloné dans le vecteur pCRII (Invitrogen). Le fragment ainsi cloné possède un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction Xho I (fragment 1-367).

- les oligonucléotides 5'-AS1, 5'-AS2, 3'-AS1 et 3'-AS2 ont été 10 phosphorylés puis hybridés ensemble pour constituer le fragment codant pour les 19 derniers acides aminés du produit d'épissage alternatif de la protéine p53 murine.

5'-AS1 (SEQ ID n° 9) :

TCG AGC CCT GCAG C CTAG AGC CCT CCA AGC CC CT CAT GA AGG AGG

15 5'-AS2 (SEQ ID n° 10) :

AAAG CCC CAA ACT GCT GAT GAAT CGA TAT CGC

3'-AS1 (SEQ ID n° 11) :

TGAG GG CCT TGG AAGG CTCT AGG CT GCAG GC

3'-AS2 (SEQ ID n° 12) :

20 GGCC CGCG ATAT CGATT CAT CAG CAG TTT GGG CTT CCT CCT CA

Ce fragment a ensuite été inseré au niveau du site Xho I du fragment 1-367 (voir figure 2). Le gène ainsi construit code pour le variant humain du produit d'épissage alternatif de la protéine p53 murine (AS).

La séquence protéique ainsi modifiée est la suivante:

	364	367		386
	I            I			
393				
5	I			I
	p53:- A H S S H L K S K K G Q S T S R H K K L M F K T E G P D			
	S D Z			
	AS: - A H S S L Q P R A F Q A L M K E E S P N C Z Z			
	367:- A H S S Z Z			

10            A3 - Construction d'ADNc codant pour différents fragments de la protéine p53 portant le domaine de liaison à l'ADN.

Cet exemple décrit la construction de différents ADNc codant pour différents fragments de la protéine p53 humaine, portant tout ou partie du domaine de liaison à l'ADN de p53. Ces fragments sont ensuite utilisés dans 15 la construction des variants de p53. Ces fragments ont été obtenus par réaction d'amplification par la polymérase sur les matrices décrites dans les exemples A1 et A2 au moyen de différents oligonucléotides. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans les conditions décrites dans l'exemple A4.1.

20            A3.1 - Construction d'un ADNc codant pour la région 75-325 de p53 et de son dérivé H182

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 325 de la protéine p53 humaine sauvage (75-325).

25            Cet ADNc a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de p53 (décris dans l'exemple A1) avec les oligonucléotides 5'-75 et 3'-325 suivants :

5'-75 (SEQ ID n° 13) :

GGGAAGCTTGGGCCGGGTCGACCTGCACCAAGCAGCTCCT

3'-325 (SEQ ID n° 14) :

GGCGGCCGCGGATCCCCATCCAGTGGTTCTT

Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu 5 par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 de séquence :

Oligonucléotide H182 3' (SEQ ID n° 15) :

ATCTGAATGGCGCTC

Ce fragment a été désigné 75-325(H182).

10 A3.2 - Construction d'un ADNc codant pour la région 75-336 de p53 et de son dérivé H182

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 336 de la protéine p53 humaine sauvage (75-336).

15 Cet ADNc a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1) avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n° 13) et 3'-336 suivant :

3'-336 (SEQ ID n° 16) :

GGCGGCCGCGGATCCTCACGCCACGGATCTG

20 Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 (SEQ ID n° 15). Ce fragment a été désigné 75-336(H182).

### A3.3 - Construction d'un ADNc codant pour la région 75-343 de p53

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 343 de la protéine p53 humaine sauvage (75-343).

Cet ADNc a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) 5 sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1) avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n°13) et 3'-343 suivant :

3'-343 (SEQ ID n° 35) :

CGGATCCTCTCGAACATCTCGAA

### A3.4 - Construction d'un ADNc codant pour la région 75-367 de p53 et 10 de son dérivé H182

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 367 de la protéine p53 humaine sauvage (75-367).

Ce fragment a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de p53 décrit dans l'exemple A1 avec les oligonucléotides 5'-75 15 (SEQ ID n° 13) et 3'-367 (SEQ ID n° 8).

Le fragment ainsi obtenu inclut un site de reconnaissance par l'endonucléase Xhol (75-367).

Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu 20 par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 (SEQ ID n° 15). Ce fragment a été désigné 75-367(H182).

### A3.5 - Construction d'un ADNc codant pour le fragment 75-AS et de son dérivé H182

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 366 de la protéine p53 humaine sauvage (75-366) additioné des 19 derniers acides aminés du produit de splicing alternatif de la protéine p53 murine.

5 Ce fragment a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN du fragment AS décrit dans l'exemple A2 avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n° 13) et 3'-AS2 (SEQ ID n° 12).

10 Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 (SEQ ID n° 15). Ce fragment a été désigné 75-AS(H182).

A3.6 - Construction d'un ADNc codant pour le fragment 75-393 de p53 et de son dérivé H182

15 Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 75 à 393 de la protéine p53 humaine (75-393). Ce fragment a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN p53 décrit dans l'exemple A1 avec les oligonucléotides 5'-75 (SEQ ID n° 13) et 3'-393 (SEQ ID n° 7).

20 Un dérivé de ce fragment portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 182 de la protéine p53 humaine (cystéine -> Histidine) a été obtenu par mutagénèse dirigée au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H182 (SEQ ID n° 15). Ce fragment a été désigné 75-393(H182).

25 A4 - Construction d'ADNc codant pour différents fragments portant un domaine activateur de la transcription (domaine transactivateur).

Cet exemple décrit la construction de différents ADNc codant pour différents fragments portant un domaine transactivateur. Ces fragments sont ensuite utilisés dans la construction des variants de p53.

#### A4.1 - Réactions de PCR

5 Les différents fragments ont été obtenus par réaction d'amplification par la polymérase sur différentes matrices au moyen de différents oligonucléotides. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans les conditions suivantes : Enzyme AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer) dans le tampon fourni par le fournisseur, avec une concentration de dNTP de  
10 0,2 mM, 100 ng de matrice et 500 ng de chacun des deux oligonucléotides.

- cycle: 2 min à 91°C  
- cycles: 1 min à 91°C  
15 1 min à 55°C  
1 min à 72°C  
- cycle: 5 min à 72°C

#### A4.2 - Construction d'un ADNc codant pour la région 411-490 de la protéine virale VP16 (VP16 TA)

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 411-490 de la protéine virale VP16 (VP16 TA). Cette région porte le  
20 domaine transactivateur de cette protéine.

Le fragment transactivateur dérivé de la protéine virale VP16 (411-490) du virus de l'herpès simplex a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) en utilisant les conditions précédemment définies (Cf A4.1) et les oligonucléotides 5'-VP16 et 3'-VP16 suivants:

25 5'-VP16 (SEQ ID n° 17):

AAGCTTGAATTCGTTAACATGTCCACGGCCCCCGACC

3'-VP16 (SEQ ID n° 18) :

GGTCGACCACCGTACTCGTCAAT

et 100 ng du plasmide pUHD15-1 (Gossen & Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5547)

5 Le fragment ainsi obtenu comprend 334 paires de bases dont la séquence est donnée SEQ ID n° 2. Il comprend dans sa partie N-terminale un résidu méthionine apporté par le site d'initiation de la transcription (ATG), ajouté lors de l'étape de clonage par PCR.

10 A4.2 - Construction d'ADNc codant pour différents fragments capables de recruter le domaine activateur de la transcription (domaine transactivateur) d'une protéine p53 endogène.

A4.2.1 - Construction d'un ADNc codant pour un anticorps simple chaîne capable de lier la protéine p53 (ScFv 421)

15 Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour un anticorps simple chaîne capable de lier la protéine p53 (ScFv 421). Cette construction exprimée au niveau intracellulaire, doit être capable de fixer une protéine p53 endogène sauvage ou mutante pour recruter son domaine transactivateur.

20 Le cDNA codant pour le ScFv 421 (demande de brevet PCT/FR96/00477) peut-être extrait sous la forme d'un fragment Nco I / Not I qui comprend un site d'initiation de la traduction (ATG) et aucune séquence d'arrêt de la traduction.

Le fragment ainsi obtenu comprend 766 paires de bases dont la séquence est donnée SEQ ID n° 36.

25 A4.2.2 - Construction d'un ADNc codant pour la région 325-360 de la protéine p53 sauvage (325-360)

5 Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 325-360 de la protéine p53 sauvage (325-360). Cette région porte le domaine d'oligomérisation de cette protéine. Cette construction exprimée au niveau intracellulaire, doit être capable de fixer une protéine p53 endogène sauvage ou mutante pour recruter son domaine transactivateur.

Ce domaine d'oligomérisation dérivé de la protéine p53 sauvage humaine (325-360) a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) en utilisant les conditions précédemment définies (Cf A4.1) et les oligonucléotides 5'-325 et 3'-360 suivants:

10 5'-325 (SEQ ID n° 37):

AAGCTTGAATTCGTTAACGCCACCATGGGAGAATATTCAC  
CCTT

3'-360 (SEQ ID n° 38) :

GGGTCGACCTGGCTCCTTCCCAGC

15 sur 100 ng de l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1).

20 Le fragment ainsi obtenu comprend 141 paires de bases dont la séquence est donnée SEQ ID n° 39. Il comprend dans sa partie N-terminale un résidu méthionine apporté par le site d'initiation de la traduction (ATG), ajouté lors de l'étape de clonage par PCR et aucune séquence d'arrêt de la traduction.

#### A4.2.3 - Construction d'un ADNc codant pour la région 325-393 de la protéine p53 sauvage (325-393)

25 Cet exemple décrit la construction d'un ADNc codant pour les acides aminés 325-393 de la protéine p53 sauvage (325-393). Cette région porte le domaine d'oligomérisation de cette protéine. Cette construction exprimée au niveau intracellulaire, doit être capable de fixer une protéine p53 endogène sauvage ou mutante pour recruter son domaine transactivateur.

Ce domaine d'oligomérisation dérivé de la protéine p53 sauvage humaine (325-360) a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) en utilisant les conditions précédemment définies (Cf A4.1) et les oligonucléotides 5'-325 (SEQ ID n° 37) et 3'-393.2 suivant:

5 3'-393.2 (SEQ ID n° 40) :

GGGTCGACCGTCTGAGTCAGGCCCTTC

sur 100 ng de l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple A1).

Le fragment ainsi obtenu comprend 243 paires de bases dont la séquence est donnée SEQ ID n° 41. Il comprend dans sa partie N-terminale 10 un résidu méthionine apporté par le site d'initiation de la traduction (ATG), ajouté lors de l'étape de clonage par PCR et aucune séquence d'arrêt de la traduction.

A5 - Construction d'ADNc codant pour différents fragments portant un domaine d'oligomérisation.

15 Cet exemple décrit la construction de différents ADNc codant pour différents fragments portant un domaine d'oligomérisation. Ces fragments sont ensuite utilisés dans la construction des variants de p53. Ces fragments ont été obtenus par réaction d'amplification par la polymérase sur différentes matrices (p53 pour le domaine homologue et matrices d'origine différentes 20 pour les domaines d'oligomérisation hétérologues, notamment artificiels) au moyen de différents oligonucléotides. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans les conditions décrites en A4.1 ci-dessus.

A5.1 - Construction d'un ADNc comprenant un domaine d'oligomérisation artificiel.

25 Cet exemple décrit la construction d'un ADNc comprenant un domaine d'oligomérisation artificiel, constitué d'un leucine zipper artificiel. Cet ADNc est ensuite utilisé pour la construction de variants à partir des fragments

75-325 (exemple A3.1) et 75-336 (exemple A3.2.) de la protéine p53 humaine et de leurs dérivés modifiés au niveau de la cystéine 182.

Cet ADNc a été construit à partir des 6 oligonucléotides suivants.

Iz1-5' (SEQ ID n° 19) :

5 GATCTGAAGGCCCTCAAGGAGAAGCTGAAGGCC

Iz2-5' (SEQ ID n° 20) :

CTGGAGGAGAAGCTGAAGGCCCTGGAGGAGAAGCTG

Iz3-5' (SEQ ID n° 21) :

AAGGCACTAGTGGGGAGCGATGATGAATCGATATCGC

10 Iz1-3' (SEQ ID n° 22) :

CTCCTCCAGGGCCTTCAGCTTCTCCTTGAGGGCCTTCA

Iz2-3' (SEQ ID n° 23) :

TAGTGCCTTCAGCTTCTCCTCAGGGCCTTCAGCTT

Iz3-3' (SEQ ID n° 24) :

15 GGCGCGATATCGATTCAATCGCTCCCCCAC

Ces oligonucléotides ont été synthétisés au moyen d'un synthétiseur automatique d'ADN, en utilisant la chimie des phosphoramidites. Ces six oligonucléotides présentent des complémentarités deux à deux (Iz1-5'/Iz1-3', Iz2-5'/Iz2-3', Iz3-5'/Iz3-3') et des complémentarités chevauchantes (Iz1-3'/Iz2-5', Iz2-3'/Iz3-5') permettant l'obtention du domaine d'oligomérisation par simple hybridation et ligation. La séquence LZ résultante est donnée SEQ ID n° 1.

A5.2 - Construction d'un ADNc comprenant le domaine d'oligomérisation naturel de la p53 humaine.

Cet exemple décrit la construction d'un ADNc comprenant le domaine d'oligomérisation naturel de la p53 humaine. Cet ADNc est représenté par le fragment codant pour les acides aminés 325 à 356 de p53 contenu dans les constructions 75-367 (exemple A3.4), 75-AS (exemple A3.5), 75-393 (exemple A3.6) et de leurs dérivés modifiés au niveau de la cystéine 182.

**Exemple B - Construction des genes codant pour differents variants de la protéine p53**

**B1 - Clonage des differents fragments de p53**

Chacun des différents fragments obtenus par PCR décrit dans 10 l'exemple A a été cloné après PCR dans le vecteur pBC SK+ (Stratagène) en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction Hind III et Not I (Figure 3).

Les produits de ces constructions portent les numéros suivants:

15	75-325	--> pEC 104
	75-336	--> pEC 106
	75-343	--> pEC 171
	75-367	--> pEC 131
	75-AS	--> pEC 132
	75-393	--> pEC 133

20 A partir de ces produits et par mutagénèse dirigée en utilisant l'oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system (Amersham) et l'oligonucléotide H182, ont été obtenues les constructions correspondantes portant une histidine en position 182. Ces constructions portent les numéros suivants:

25	75-325(H182)	--> pEC 134
	75-336(H182)	--> pEC 135

75-367(H182)	--> pEC 136
75-AS(H182)	--> pEC 137
75-393(H182)	--> pEC 138

B2 - Fusion du leucine-zipper aux fragment 75-325, 75-336 et 75-343  
5 et à leur variant H182

Les oligonucléotides constituant le leucine-zipper (Iz1-5', Iz1-3', Iz2-5',  
Iz2-3', Iz3-5' et Iz3-3') ont été phosphorylés à l'aide de la T4 kinase, puis  
hybridés tous ensemble et insérés dans les vecteurs pEC 104, 106, 134 et  
135 et 171 préalablement digérés par les enzymes de restriction BamHI et  
10 NotI (Figure 4).

Les produits de ces constructions portent les numéros suivants:

75-325-Iz	--> pEC 107
75-336-Iz	--> pEC 110
75-343-Iz	--> pEC 174
15 75-325(H182)-Iz	--> pEC 139
75-336(H182)-Iz	--> pEC 140

B3 - Fusion du domaine activateur de la transcription à l'ensemble des  
fragments p53

Les produits finaux ont été obtenus par une ligation à trois partenaires  
20 effectuée de la façon suivante (Figure 5):

Le domaine activateur de la transcription dérivé de VP16 décrit dans  
l'exemple A3 a été préparé par digestion enzymatique des produits de PCR  
par les enzymes de restriction Hind III et Sal I.

Les différents fragments p53 précédemment obtenus (75-325-Iz,  
25 75-336-Iz, 75-343-Iz, 75-AS, 75-367, 75-393 et leurs variants H182) ont été

isolés après digestion enzymatique des plasmides les contenant par les enzymes de restriction Sall et NotI.

Les combinaisons possibles (domaine activateur/p53) ont été constituées et insérées simultanément dans le vecteur pBC SK+ (Stratagène) 5 préalablement digéré par les enzymes de restriction Hind III et Not I.

Les produits de ces constructions portent les numéros suivants:

	VP16-75-325-lz	V-325	--> pEC 114 (SEQ ID n° 25)
	VP16-75-336-lz	V-336	--> pEC 116 (SEQ ID n° 26)
	VP16-75-367	V-367	--> pEC 141 (SEQ ID n° 27)
10	VP16-75-AS	V-AS	--> pEC 143 (SEQ ID n° 28)
	VP16-75-393	V-393	--> pEC 145 (SEQ ID n° 29)
	VP16-75-343-lz	V-343	--> pEC 175 (SEQ ID n° 30)
	VP16-75-325(H182)-lz	V-325H	--> pEC 147
	VP16-75-336(H182)-lz	V-336H	--> pEC 149
15	VP16-75-367(H182)	V-367H	--> pEC 151
	VP16-75-AS(H182)	V-ASH	--> pEC 153
	VP16-75-393(H182)	V-393H	--> pEC 155

Les produits correspondants portant un domaine liant spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur à la place du domaine 20 VP16 sont construits de la même façon. Ces constructions sont désignées ci-dessous :

	ScFv-75-325-lz	S-325	--> pEC 176 (SEQ ID n° 31)
	ScFv-75-336-lz	S-336	
	ScFv-75-367	S-367	
25	ScFv-75-AS	S-AS	
	ScFv-75-393	S-393	
	ScFv-75-325(H182)-lz	S-325H	
	ScFv-75-336(H182)-lz	S-336H	

	ScFv-75-367(H182)	S-367H
	ScFv-75-AS(H182)	S-ASH
	ScFv-75-393(H182)	S-393H
	(325-393)-75-325-lz	393-325 --> pEC 177 (SEQ ID n° 32)
5	(325-393)-75-336-lz	393-336
	(325-393)-75-367	393-367
	(325-393)-75-AS	393-AS
	(325-393)-75-393	393-393
	(325-393)-75-325(H182)-lz	393-325H
10	(325-393)-75-336(H182)-lz	393-336H
	(325-393)-75-367(H182)	393-367H
	(325-393)-75-AS(H182)	393-ASH
	(325-393)-75-393(H182)	393-393H
	(325-360)-75-325-lz	360-325 --> pEC 178 (SEQ ID n° 33)
15	(325-360)-75-336-lz	360-336
	(325-360)-75-367	360-367
	(325-360)-75-AS	360-AS
	(325-360)-75-393	360-393
	(325-360)-75-325(H182)-lz	360-325H
20	(325-360)-75-336(H182)-lz	360-336H
	(325-360)-75-367(H182)	360-367H
	(325-360)-75-AS(H182)	360-ASH
	(325-360)-75-393(H182)	360-393H

Les produits contenant le domaine 325-360 de la p53 en  
 25 remplacement du domaine transactivateur (1-74) peuvent se voir additionner  
 un séparateur synthétique (Hinge) obtenu par insertion au site Sal I d'un  
 fragment d'ADN obtenu par hybridation de la paire d'oligonucléotides  
 synthétiques complémentaires Hinge-up et Hinge-down suivants:

Hinge-up (SEQ ID n° 42) :

TCGAGGAGGTGGTGGCTCTGGAGGC GGAGGATCCGGCGGTGGA  
GGTTC

Hinge-down (SEQ ID n° 43) :

TCGAGAACCCCTACCGCCGGATCCTCCGCCTCCAGAGGCCACCAC

5 CTCC

La séquence d'ADN double brin Hinge résultante est la suivante

TCGAGGAGGTGGTGGCTCTGGAGGC GGAGGATCCGGCGGTGGAGGTTTC  
CCTCCACCACCGAGACCTCCGCCTCCTAGGCCGCATCCCCAAGAGCT

et la séquence protéique correspondante est (SEQ ID n° 44):

10 Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser

Les produits correspondants sont désignées ci-dessous :

(325-360)-Hinge-75-325-lz	360h-325--> pEC 179 (SEQ ID n° 34)
(325-360)-Hinge-75-336-lz	360h-336
(325-360)-Hinge-75-367	360h-367
15 (325-360)-Hinge-75-AS	360h-AS
(325-360)-Hinge-75-393	360h-393
(325-360)-Hinge-75-325(H182)-lz	360h-325H
(325-360)-Hinge-75-336(H182)-lz	360h-336H
(325-360)-Hinge-75-367(H182)	360h-367H
20 (325-360)-Hinge-75-AS(H182)	360h-ASH
(325-360)-Hinge-75-393(H182)	360h-393H

**Exemple C - Construction de vecteurs d'expression des variants de p53**

Cet exemple décrit la construction de vecteurs utilisable pour le  
25 transfert des acides nucléiques de l'invention in vitro ou in vivo.

### C1 - Construction de vecteurs plasmidiques

Pour la construction de vecteurs plasmidiques, 2 types de vecteurs ont été utilisés.

- Le vecteur pSV2, décrit dans DNA Cloning, A practical approach Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. Ce vecteur est un vecteur d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les variants ont été insérés dans ce vecteur sous forme de fragments HpaI-EcoRV. Ils sont ainsi placés sous le contrôle du promoteur de l'enhancer du virus SV40.
- 10 - Le vecteur pCDNA3 (Invitrogen). Il s'agit également d'un vecteur d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les variants de l'invention sont ainsi placés, dans ce vecteur, sous le contrôle du promoteur précoce du CMV. Toutes les constructions décrites dans l'exemple B3 ont été introduites dans ce vecteur sous forme d'un fragment Hind III / Not I pour 15 être testées dans les différents systèmes d'évaluation *in vivo*.

### C2 - Construction de vecteurs viraux

Selon un mode particulier, l'invention réside dans la construction et l'utilisation de vecteurs viraux permettant le transfert et l'expression *in vivo* des acides nucléiques tels que définis ci-avant.

- 20 S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi 25 les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus

d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

5       Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et un acide nucléique selon l'invention. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique 10 connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues *in vitro* (sur de l'ADN isolé) ou *in situ*, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents 15 mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation 20 préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et l'acide nucléique de l'invention (Cf FR94 13355). Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

25       Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la 30 séquence d'ADN d'intérêt. La recombinaison homologue se produit après

co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de complémenter la partie du génome de l'adénovirus défectif,

5 de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 203 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de

10 complémenter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

15 Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils

20 ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réPLICATION pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant

25 les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réPLICATION virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans

5 lesquelles les gènes rep et/ou cap sont déletés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire

10 humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant une séquence nucléique de l'invention d'intérêt bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Une lignée cellulaire utilisable est par exemple la lignée 293. Les AAV recombinants produits sont

15 ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env).

20 25 Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement déletés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey

sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants selon l'invention comportant un acide nucléique selon l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ledit acide nucléique est construit, puis utilisé pour transfacter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes dans les cellules tumorales.

### C3 - Vecteurs chimiques

Parmi les vecteurs synthétiques développés, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention les polymères cationiques de type polylysine, (LKLK)<sub>n</sub>, (LKKL)<sub>n</sub>, polyéthylène immine et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolymamines

(lipofectamine, transfectam, etc) différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ainsi que des peptides d'origine nucléaire. En outre, le concept de la transfection ciblée a été développé, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au 5 polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes a 10 ainsi été décrit. La préparation d'un composition selon l'invention utilisant un tel vecteur chimique est réalisée selon toute technique connue de l'homme du métier, généralement par simple mise en contact des différents composants.

#### Exemple D - Evaluation fonctionnelle des variants de p53

15 Les variants de p53 selon l'invention ont été évalués en test cellulaire pour les critères suivants:

- liaison à une séquence d'ADN double brin spécifique
- fonction transactivatrice
- activité antiproliférative
- 20 - activité apoptotique
- potentiel oncogénique associé à certaines mutations de p53

Les constructions utilisées plus particulièrement pour cette évaluation sont les constructions V-325, V-336 , V-343 et AS décrites dans l'exemple B.

25 D1 Reconnaissance de séquences d'ADN double brin spécifiques par les molécules hybrides de l'invention

##### D1.1 Production des molécules hybrides

Le cDNA de la p53 sauvage a été cloné dans le vecteur pBlueBacIII (Invitrogen) au site BamHI. Par insertion dans le plasmide pAcHLT-A (Pharmingen) du fragment contenant le cDNA de V325 obtenu par digestion du plasmide pEC114 par les enzymes EcoR I et Not I a été généré un vecteur permettant l'obtention d'un baculovirus recombinant ayant pour but l'expression d'une protéine V325 étiquetée en N-terminale par une séquence peptidique contenant entre autres un enchainement de 6 résidus histidine. A partir de ces vecteurs, des baculovirus recombinants ont été produits et purifiés suivant les instructions des fabricants (Invitrogen, Pharmingen). Les deux protéines ont été purifiées à homogénéité à partir d'extraits nucléaires de cellules d'insectes SF9 infectées par leur baculovirus respectif, les extraits nucléaires étant obtenus en suivant la procédure décrite par Delphin et al. (C. Delphin, Eur. J. Biochem., 223, 683-692, 1994).

La p53 sauvage est purifiée par immuno-affinité sur l'anticorps monoclonal pAb421 (Oncogene Sciences, Ab-1) suivant le protocole suivant: l'extrait nucléaire des cellules infectées est incubé 3 h à 4 °C avec un gel de protéine A-agarose sur lequel a été couplé covallement l'anticorps pAb421. Après lavage extensif du gel par un tampon 50 mM TrisHCl pH 7,8 contenant 1 M KCl et des inhibiteurs de protéases, la protéine p53 est éluée par le peptide correspondant à l'épitope reconnu par cet anticorps sur p53 (KKGQSTSRHK), ce peptide étant utilisé à une concentration de 5 mg/ml dans la solution utilisée pour le lavage. Après concentration sur Centricon-30 (Amicon Grace), la p53 éluée est séparée du peptide et purifiée à homogénéité par perméation sur gel sur une colonne de Superose 6 HR10/30 équilibrée par 50 mM TrisHCl pH 7,5, 0,2 M NaCl, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 0,1 % NP-40, 5 % Glycerol. Les fractions contenant p53 sont aliquotées et immédiatement congelées à - 80 °C jusqu'à utilisation.

La protéine V325 étiquetée en N-terminale par une séquence peptidique contenant entre autres un enchainement de 6 résidus histidine

appelée désormais HisV325 a été purifiée par une procédure adaptée de Hochuli et al. (Bio/Technology Vol 6 (1988) 1321). Avant d'être appliquée sur le gel de Nickel-NTA agarose, l'extrait nucléaire des cellules infectées est dessalé sur une colonne PD10 (Pharmacia) équilibrée en tampon 50 mM phosphate de sodium pH 8 contenant 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,1 % NP-40 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. L'incubation de l'extrait nucléaire avec le gel de Nickel-NTA agarose a été réalisée dans ce tampon pendant 1 h à 4 °C sous agitation. Le gel est ensuite lavé extensivement par le même tampon à pH 6. La protéine HisV325 est élue par 0,3 M imidazole dans ce dernier tampon après lavage du gel en 0,1 M imidazole. Les fractions contenant HisV325 sont aliquotées et immédiatement congelées à - 80 °C jusqu'à utilisation.

#### D1.2 Construction de la séquence d'ADN double brin spécifique

La séquence d'ADN double brin spécifique utilisée dans cette expérience est constituée de deux oligonucléotides de synthèse dont la séquence est la suivante:

Oligo 5568 (SEQ ID n°45):

GATCCGAACATGTCCAACATGTTGA

Oligo 5569 (SEQ ID n°46):

20 AGCTTCAACATGTTGGGACATGGTCG

Ces deux oligonucléotides de synthèse ont été marqués au phosphore 33 par incubation de 30min à 37°C de 5 pmoles de chaque oligonucléotide dans 20  $\mu$ l du milieu réactionnel suivant:

25	Tris-HCl pH7,6	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	dithiothréitol	5 mM
	Spermidine	100 $\mu$ M

EDTA	100 $\mu$ M
ATP- $\gamma$ - $^{33}$ P (Amersham)	50 $\mu$ Ci (1000-3000 Ci/mmole)
T4 kinase (Boehringer)	10 U

5 Puis les deux oligonucléotides ainsi marqués ont été hybridés en présence de 100 mM NaCl pour reconstituer la séquence double brin WAF-RE suivante contenant la séquence spécifique reconnue par p53 dans la région promotrice du gène WAF-1 (W.S. El-Deiry, Cell Vol75 (1993) 817):

GATCCGAACATGTCCCAACATGTTGA  
GCTTGTACAGGGTTGTACAACCTTCGA

10 D1.3 Reconnaissance de la séquence double brin WAF-RE par les molécules hybrides de l'invention.

Pour mettre en évidence une reconnaissance spécifique de la séquence double brin WAF-RE par les molécules hybrides de l'invention, des expériences de retard sur gel ont été réalisées sur le principe décrit ci-après.

15 La réaction de liaison à l'ADN est effectuée dans 25  $\mu$ l de milieu réactionnel (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub>, 5 mM dithiotreitol, 0,1 mg/ml BSA, 10 % glycérol, 1% Nonidet P-40, 0,1M NaCl, 2  $\mu$ g/ml aprotinine, 2  $\mu$ g/ml E-64, 2  $\mu$ g/ml leupeptine, 2  $\mu$ g/ml pepstatine) par addition de la séquence WAF-RE (2,4 10<sup>-9</sup> M) préparé selon l'exemple précédent, de 1,2 10<sup>-6</sup> M de l'oligonucléotide compétiteur froid AP2 (Promega) utilisé pour éliminer la fixation non spécifique et de 30 ng de molécules hybrides à tester en présence ou non de p53 sauvage (entre 3 et 30 ng), la p53 sauvage pouvant être activée pour son activité de fixation spécifique à l'ADN par 300 ng d'anticorps pAb421 (T. R. Hupp, Cell Vol 71 (1992) 875). Les mélanges réactionnels sont incubés 30 minutes sur glace et les mélanges finaux sont soumis à une électrophorèse native sur gel de polyacrylamide à 4 % avec migration à 200V et 16°C . Le gel est ensuite séché et autoradiographié.

Le résultat d'une expérience représentative de compétition entre p53 sauvage et HisV325 en retard sur gel est présenté sur la Figure 6. Ce résultat montre que His-V325 reconnaît la séquence double brin WAF-RE avec une affinité comparable à celle de la p53 sauvage. On notera que 5 HisV325 donne une bande majoritaire en gel retard qui migre plus vite que celle obtenue avec la p53 sauvage. Ceci pourrait indiquer que HisV325 se fixe sous forme de dimère. De plus, comme attendu, cette bande n'est ni déplacée, ni amplifiée par la présence de pAb421. Enfin, en l'absence de pAb421, la p53 sauvage fixe beaucoup moins de RE-WAF que ne le fait 10 V325.

#### D2 - Evaluation de la fonction transactivatrice

La fonction transactivatrice des constructions a été évaluée dans un système de transactivation *in vivo* dans les cellules SAOS-2 (ostéosarcome humain) déficientes pour les deux allèles de la protéine p53 (cellules accessibles à l'ATCC sous le numéro HTB85) et dans des lignées tumorales 15 H358 (Maxwell & Roth, Oncogene 8 (1993), 3421) et HeLa (ATCC CCL 2). Ce système repose sur l'utilisation d'un gène rapporteur dosable enzymatiquement et placé sous la dépendance d'un promoteur contenant les motifs nucléotidiques de reconnaissance spécifique par la forme sauvage de 20 la p53 (cf protocoles expérimentaux).

Dans ce test, le gène rapporteur est le gène CAT (chloramphénicol-acétyl transférase) et la séquence de reconnaissance par la p53 est la séquence consensus (p53RE) définie par Funk et collaborateurs (Mol. Cell. Biol. 12 (1992) 2866).

25 L'évaluation de cette fonction a été effectuée en comparaison avec celle de la protéine sauvage pour trois types de critères différents.

## D2.1 - Activité transactivatrice en dose réponse

Les cellules ( $3,5 \cdot 10^5$ ) sont ensemencées dans des boites de Pétri de 6 cm de diamètre contenant 3 ml de milieu DMEM (Gibco BRL) additioné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur, et cultivées sur la nuit

5 dans un incubateur à  $CO_2$  (5%) à 37°C. Les différentes constructions sont alors transfectées en utilisant la lipofectAMINE (Gibco BRL) comme agent de transfection de la façon suivante: 3  $\mu$ g de plasmide total sont incubés (dont 0,5  $\mu$ g du plasmide reporter) avec 10  $\mu$ l de lipofectAMINE pendant 30 min avec 3 ml de milieu Opti-MEM (Gibco BRL) sans sérum (mélange de transfection). Pendant ce temps, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis incubées 4 h à 37°C avec le mélange de transfection, après quoi celui-ci est aspiré et remplacé par 3 ml de milieu DMEM additioné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et les cellules remises à pousser pendant 10 48 h à 37°C.

## 15 Protocole de dosage de l'activité CAT

48h après la transfection, les cellules sont lavées une fois en PBS puis grattées et récupérées dans 100 µl de tampon Tris 0,25 M pH 8 et à lysées par trois cycles de congélation - décongélation dans un bain éthanol/carboglace. L'extrait cellulaire total ainsi obtenu est mis à centrifuger 15 min à 10000 rpm et le surnageant récupéré pour le dosage de l'activité. Celui-ci est effectué en additionnant 20 µl d'extrait cellulaire à 130 µl d'un mélange réactionnel dont la composition finale est la suivante:

25	- Acétyl-Coenzyme A	0,4 mM
	- Chloramphénicol, D-thréo-(dichloroacétyl-1,2- <sup>14</sup> C)	23 µM (200 nCi)
	- Tris	0,18 M pH 8

Après 1 heure d'incubation à 37°C, les produits de la réaction sont extraits par 250 µl d'acétate d'éthyle dont 20 µl sont déposés sur une plaque de silice (chromatographie en couche mince) mise à migrer dans un mélange

contenant 95% de chloroforme et 5% de méthanol. La plaque de chromatographie ainsi obtenue est enfin révélée à l'aide d'un instantimager (Packard instruments) qui permet de calculer le rapport des différents produits d'acétylation, rapport qui reflète l'activité de l'enzyme

5 Chloramphénicol-Acetyl-Transférase et donc l'activité transactivatrice des différentes constructions.

Les résultats obtenus dans la lignée SAOS-2 avec les constructions placées sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3) et présentés dans les Figures 7 et 8 montrent les propriétés suivantes pour chacune des

10 constructions:

- la protéine p53 présente une activité dose-dépendante qui tend vers la saturation pour des doses élevées (à partir de 100ng de plasmide). Cette saturation peut traduire la nécessité de cofacteurs qui seraient limitants dans ces conditions.

15 - la protéine AS conserve la capacité d'activer la transcription de la protéine sauvage

- les protéines V-325, V-336 et V-343 présentent, tout comme la protéine p53, une activité transactivatrice qui ne semble pas quant à elle saturable aux fortes doses. Il est donc possible que cette absence apparente

20 de saturation puisse conduire à une augmentation globale de l'activité. Il apparaît en outre que la construction V-325 est plus active que ses homologues V-336 et V-343, ce qui suggère que les protéines chimères portant la région 75-325 sont particulièrement avantageuses.

Dans le but de confirmer ces propriétés une expérience similaire a été

25 effectuée dans la lignée tumorale H 358 qui est tout comme la lignée SAOS-2, déficiente pour les deux allèles du gène p53. Dans cette expérience, chaque transfection a été effectuée avec 50 ng de chacune des construction placée sous dépendance du promoteur CMV. Les résultats présentés sur le

Tableau 1 montrent clairement que les deux variants V-325 et V-336 présentent une activité transactivatrice améliorée par rapport à celle de la protéine p53 sauvage, avec de nouveau une meilleure activité du variant V-325.

5 Tableau 1: Activité transactivatrice dans les cellules de la lignée tumorale H 358.

	pCDNA 3	p53 sauvage	V-325	V-336
Activité CAT Relative	1	6	25	16

Ces deux essais confirment que les variants de l'invention possèdent au moins une des propriétés de la p53 améliorée.

Afin de vérifier que cette différence d'activité n'est pas due à une 10 différence d'expression mais bien à une activité accrue des variants de l'invention, le niveau d'expression de la protéine p53 sauvage et des variants V-325, V-336 et V-343 a été analysé dans les cellules SAOS-2. Pour ce faire les cellules sont transfectées par 3 $\mu$ g de chacun des plasmides utilisés dans l'expérience précédente, et récupérées 24 heures et 48 heures après la 15 transfection. Après deux lavages en tampon PBS (Gibco BRL), les cellules sont lysées 15 minutes à 4°C dans 50 $\mu$ l de tampon RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet-P40, 1% déoxycholate de sodium, 0,1% dodécylique sulfate de sodium) additionné de 2 mM PMSF, 20  $\mu$ g/ml aprotinine, 2  $\mu$ g/ml E64, 2  $\mu$ g/ml leupeptine et 2  $\mu$ g/ml pepstatine. 20 Après 15 min de centrifugation à 15000 rpm, les surnageants sont prélevés, additionnés de tampon de migration (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970) et soumis à électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant à 200V suivant le protocole précédemment décrit (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970). Puis les protéines sont transférées sur 25 membrane de PVDF (NEN Research Products) en utilisant le système de transfert semi-sec NOVEX suivant les recommandations du fabricant, et révélées à l'aide de l'anticorps monoclonal pAb 240 (Oncogene Sciences,

Ab-3) et d'un anticorps secondaire (lapin anti-souris) couplé à la peroxydase (Nordic Immunology) en utilisant le kit ECL (Amersham).

Le résultat de cette expérience présenté dans la Figure 9 montre que les variants V-325 et V-336 sont exprimés à un niveau comparable à celui de la protéine p53 sauvage et que le variant V-343 semble légèrement mieux exprimé que les précédents. De plus la comparaison des niveaux d'expression à 24 et 48 heures semble indiquer que la stabilité relative de chacune des constructions est similaire. Ce résultat montre donc que l'activité accrue des variants de l'invention V-325 et V-336 n'est pas due à une meilleure expression mais probablement à un potentiel d'activateur transcriptionnel accru, contrairement au variant V-343.

Par la suite, et dans le but de confirmer cette capacité des variants de l'invention d'activer un gène placé sous la dépendance d'un élément de reconnaissance de la p53 sauvage, l'étude de l'activation de gènes endogènes a été effectuée en regardant l'expression des gènes hdm2 et WAF1, normalement induits par la protéine p53.

Cette expérience a été effectuée dans la lignée cellulaire EB (cancer du colon) déficiente pour les deux allèles codant pour la protéine p53 (Shaw et al., PNAS 89 (1992) 4495). Un clone stable exprimant la protéine p53 sous contrôle du promoteur inductible de la métallothionéine a été construit à partir de cette lignée (clone EB-1 (Shaw et al., PNAS 89 (1992) 4495)). De la même façon un autre clone stable exprimant la protéine V-325 sous contrôle du promoteur inductible de la métallothionéine a été construit en utilisant un plasmide dérivé du vecteur pmlMT1i (obtenu de P. Shaw) par insertion du cDNA codant pour la protéine V-325 aux sites EcoR I - Not I (pmlMT1i-V325). Pour ce faire, les cellules EB ( $3.5 \cdot 10^5$  cellules) ont été transfectées par 1,3 µg du plasmide pmlMT1i-V325 et 200 ng de plasmide pcDNA3 suivant le protocole précédemment décrit et les clones stables ont été sélectionés après transfection par croissance dans un milieu contenant

800µg/ml de génétidine. Un clone exprimant V-325 de façon inductible à un niveau comparable à l'expression de la protéine p53 dans le clone EB-1 a été sélectioné (clone EB-V325).

Les clones EB-1 et EB-V325 ainsi que les cellules parentales EB ( $10^6$  cellules) ont été soumis à un traitement au ZnCl<sub>2</sub> (200 µM) et des extraits cellulaires ont été effectués à différents temps et soumis à électrophorèse et transfert sur membrane comme décrit précédemment. Les protéines transférées ont été révélées par trois anticorps différents; l'anticorps monoclonal pAb240 dirigé contre la protéine p53, et deux anticorps polyclonaux dirigés l'un contre la protéine hdm2 et l'autre contre la protéine WAF1. Les résultats de cette expérience présentés dans la Figure 10, montrent que: 1) la protéine p53, absente dans les cellules EB, EB-V325 et EB-1 en l'absence d'induction, est exprimée dans le clone EB-1 dès 4 heures après le début du traitement au zinc, et le variant V-325 est exprimé de la même façon dans le clone EB-V325, 2) la protéine WAF1 dont l'expression semble être induite dans les cellules EB par le traitement au zinc 4 heures après le début de celui-ci, voit son expression prolongée jusqu'à 16 heures dans les clones EB-1 et EB-V325, et 3) l'induction de la protéine hdm2 n'est observable que dans les clones EB-1 et EB-V325, avec une expression accrue dans le clone EB-V325.

Ces résultats montrent que l'activation de la transcription par le variant V-325 se traduit par l'induction de l'expression de gènes normalement induits par la protéine p53 sauvage, et que ce variant présente bien une activité accrue dans un contexte physiologique par rapport à la protéine p53 sauvage.

#### D2.2 - Effet de la protéine E6 (HPV18) sur la fonction transactivatrice

Les protocoles utilisés sont identiques à ceux décrits dans l'exemple D1.1. Dans cette expérience de transfection, les constructions placées sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3) ont été co-transférées avec des

concentrations croissantes d'un plasmide exprimant E6 sous contrôle du promoteur SV40 (pSV2). Les résultats obtenus dans la lignée SAOS-2 et présentés dans la Figure 11 montrent les propriétés suivantes pour chacune des constructions:

5 - l'activité de la p53 décroît au fur et à mesure que l'on augmente la concentration de E6, cette décroissance étant très probablement le reflet de la dégradation de la p53 induite par E6.

- la protéine V-336 présente une absence de sensibilité à E6.

10 - la protéine V-325 semble pouvoir être légèrement activée par E6. La protéine V-325 est toujours, et dans toutes les situations observées, plus active que la p53. Pour confirmer cette différence de comportement vis-à-vis de la protéine E6, l'activité transactivatrice des constructions V-325 et V-336 dans des cellules HPV18 positives (HeLa) et donc exprimant la protéine E6, a été testée et comparée à celle de la p53 sauvage.

15 Dans cette expérience de transfection effectuée selon le protocole décrit précédemment, les différentes constructions ont été placées sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3).

20 Les résultats présentés dans la Figure 12 montrent une très nette activité transcriptionnelle des deux constructions V-325 et V-336, dans un contexte où la protéine p53 sauvage est très peu active, laissant supposer à nouveau que ces deux constructions sont insensibles à E6 contrairement à la protéine sauvage.

25 Pour tester si cette absence de sensibilité à la protéine E6 est le reflet d'une meilleure stabilité en réponse à la dégradation induite par cette protéine, une expérience de dégradation *in vitro* a été effectuée.

Les différentes molécules utilisées dans cette expérience ont été obtenues par traduction *in vitro* en lysat de réticulocytes des molécules

décrivées dans l'exemple C1 (vecteur pcDNA3) en utilisant le kit TNT Coupled Reticulocyte lysate Systems (Promega) suivant le protocole expérimental décrit par le fournisseur pour un volume réactionnel total de 50 µl.

5 Pour cette expérience, les molécules hybrides de l'invention V-325 et V-336 ainsi que la protéine p53 sauvage sont produites par traduction *in vitro* en présence de 44 µCi de <sup>35</sup>S-methionine (Amersham) (1175 Ci/mmol) pour générer ces molécules hybrides radioactivement marquées. La protéine E6 (HPV18), quand à elle est produite dans les mêmes conditions mais en absence de <sup>35</sup>S-methionine.

10 Puis 2 µl de chacun des produits radiomarqués (p53, V-325 et V-336) sont mis à incuber à 30°C avec 2 µl de protéine E6 non radiomarquée et 10 µl de lysat de réticulocyte dans un volume final de 40 µl de tampon Tris-HCl 25mM, pH 7,5, 100 mM NaCl, 3 mM DTT. La réaction est ensuite arrêtée à différents temps par prélèvement de 7,5 µl du milieu réactionnel et addition 15 de 7,5 µl de tampon de migration (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970) et les échantillons ainsi préparés sont soumis à électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant à 200 V suivant le protocole précédemment décrit (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970). Le gel est ensuite séché et révélé à l'aide d'un instantimager (Packard instruments) qui 20 permet d'estimer les quantités de variants de l'invention n'ayant pas été dégradés au cours de la réaction.

25 Le résultat de cette expérience présenté sur la figure 13 montre clairement que les variants V-325 et V-336 sont beaucoup plus résistants que la protéine p53 sauvage à la dégradation induite par E6, avec de nouveau de meilleures propriétés pour le variant V-325 en terme de résistance à la dégradation. Ces résultats reflètent bien les différences de sensibilité de la protéine p53 sauvage et des variants V-325 et V-336 à la protéine E6 observés au niveau de l'activité transcriptionnelle dans les expériences précédentes (Figures 11 et 12).

Ce comportement fait de ces deux constructions des candidats super-sauvage particulièrement avantageux pour le traitement de pathologies liées à l'infection par HPV16 ou HPV18.

5 D2.3 - Effet d'un mutant p53 dominant-négatif sur la fonction transactivatrice

Dans cette expérience, le mutant H175, décrit comme dominant oncogénique et dominant négatif vis à vis de la protéine p53 sauvage, a été utilisé. Dans cette expérience de transfection effectuée selon le protocole décrit précédemment, les différentes constructions ainsi que le mutant H175 10 ont été placés sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3). Chacune des constructions a été co-transférée avec des concentrations croissantes du plasmide exprimant le mutant H175.

Les résultats présentés dans la Figure 14 montrent les propriétés suivantes pour chacune des constructions:

15 - la protéine p53 voit son activité transactivatrice diminuer lorsqu'elle est en présence d'un excès de forme mutée H175, ce qui correspond bien à une situation physiologique puisque l'on sait que ce type de forme mutante est beaucoup plus stable que la p53 sauvage et donc toujours en excès. On mesure donc bien là l'effet dominant-négatif de ce mutant.

20 - la protéine AS présente une sensibilité accrue à l'effet dominant négatif du mutant H175, puisque sensible à des concentrations plus faibles de celui-ci.

25 - au contraire, les protéines V-325 et V-336 ne sont non seulement plus sensibles à l'effet dominant-négatif mais voient même leur activité augmentée de façon dose-dépendante en présence de la forme mutante H175. De nouveau, dans cet essai la protéine V-325 présente un effet accru par rapport à la protéine V-336 la confirmant un peu plus dans son possible statut de super-sauvage.

#### D2.4 - Effet de la protéine hdm2 sur la fonction transactivatrice

Les protocoles utilisés sont identiques à ceux décrits dans l'exemple D1.1. Dans cette expérience de transfection, les constructions placées sous contrôle du promoteur CMV (pcDNA3) sont co-transférées avec des concentrations croissantes d'un plasmide exprimant hdm2 (fragment 1-134) sous contrôle du promoteur CMV (pcDNA3). Les résultats obtenus dans la lignée SAOS-2 et présentés dans la Figure 15 montrent les propriétés suivantes pour chacune des constructions:

5 - l'activité de la protéine p53 décroît au fur et à mesure que l'on  
10 augmente la concentration de hdm2, ce qui correspond bien à une situation physiologique.

- la protéine V-325 semble être insensible à cette inhibition par hdm2.

15 Ce comportement fait de la protéine V-325 un candidat super-sauvage particulièrement avantageux pour le traitement de pathologies liées à la surexpression de hdm2, et plus particulièrement, au traitement des pathologies liées à la surexpression de protéines cellulaires interagissant avec le domaine N-terminal de la protéine p53.

20 Les résultats de ces quatre expériences montrent clairement que les variants selon l'invention, notamment les variants contenant la région 75-325-lz ou 75-336-lz, présentent 1) une activité transactivatrice accrue, 2) une sensibilité moindre à l'effet de la protéine E6 de HPV18, 3) l'absence de sensibilité à l'effet dominant-négatif de certains mutants de la p53 et même l'accroissement de son activité dans un tel contexte, et 4) une absence de sensibilité à la protéine hdm2. Ces différentes propriétés sont tout à fait 25 remarquables et inattendues et confèrent aux variants de l'invention des avantages thérapeutiques considérables.

#### D3 - Effet sur la croissance cellulaire

L'effet des constructions V-325 et V-336 sur la croissance cellulaire a été testé en parallèle avec la p53 sur différents types de lignées cellulaires dans une expérience de formation de colonies résistantes à la néomycine suite à la transfection par des plasmides exprimant ces trois protéines.

5        Dans cette expérience de transfection effectuée selon le protocole décrit précédemment, les différentes constructions ont été placées sous contrôle du promoteur CMV (pCDNA3).

**Protocole de formation de colonies résistantes à la néomycine**

10      48h après transfection, les cellules sont grattées et transférées dans des boites de Pétri de 10 cm de diamètre et remises à pousser avec 10 ml de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et contenant 400 µg/ml de généticine (G418). Suite à une sélection de 15 jours en présence de G418, le nombre de colonies Neo<sup>R</sup> est déterminé par comptage après coloration à la fuchsine.

15      Cette expérience a été effectuée sur différents types cellulaires dont le statut des protéines p53 et Ras est présenté dans le Tableau 2

**Tableau 2:** Statut des lignées cellulaires utilisées dans le test de formation de colonies NéoR

lignée	p53	Ras	surexpression hdm2	n° ATCC
SAOS-2	- / -	?	-	HTB 85
HCT 116	?	Ki-Ras muté	-	CCL 247
H 322	L 248	?	-	(*)
H 460	sauvage	Ki-Ras muté	-	HTB 177
HeLa	sauvage	?	-	CCL 2
OsA-CL	?	?	+	(**)

(\*) Putnam et al., Surg. Oncol., 1 (1993), 49

(\*\*) Oliner et al., Nature, 358, (1992), 80

5 Les résultats de ces expériences sont présentés dans le Tableau 3 et sur la Figure 16.

Tableau 3: Formation de colonies Néo<sup>R</sup>

lignée	vecteur	p53 sauvage	V-325	V-336
SAOS-2	253	17	12	13
HCT116	112	62	58	61
H 322	93	5	2	3
H 460	153	110	87	92
HeLa	172	151	31	47

Ces résultats montrent que les constructions V-325 et V-336 possèdent la capacité de bloquer la croissance cellulaire de façon au moins aussi efficace que la protéine p53 sauvage dans des contextes cellulaires où celle-ci peu fonctionner normalement (p53 sauvage ou double délétant), mais surtout qu'elles conservent cette activité même dans des contextes cellulaires où la protéine p53 sauvage est très peu active (cellules HeLa exprimant la protéine E6 de HPV18 et cellules OsA-CL présentant une surexpression de la protéine hdm2). Cette propriété confère aux variants de l'invention des avantages thérapeutiques considérables.

#### D4 - Activité apoptotique des variants de l'invention

L'activité apoptotique des variants de l'invention a été étudiée en utilisant les cellules EB, EB-1 et EB-V325 et les conditions d'induction précédemment décrites (exemple D1).

Les cellules ainsi induites ( $10^6$  cellules) sont fixées et perméabilisées par une incubation de 40 minutes dans 1 ml de Permeafix (Ortho Diagnostic

Systems Inc.), puis lavées deux fois en tampon A (PBS (Gibco BRL) additionné de 0,5% de Tween 20), avant d'être resuspendues et incubées une heure à température ambiante dans 100 µl de tampon A additionné de 2% BSA (PBS-BSA) et 1 µg de l'anticorps monoclonal pAb240. Après deux 5 nouveaux lavages en tampon PBS-BSA, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante dans 100 µl du même tampon additionné de 1 µg d'un anticorps polyclonal secondaire couplé à la fluorescéine (GAM-FITC (Immunotech)). Puis, les cellules sont lavées deux fois dans le tampon A, 10 resuspendues dans 1 ml du même tampon contenant 5 µg d'iodure de propidium et 1 mg de RNase (DNase-free), et incubées 30 min à température ambiante avant d'être analysées par cytométrie de flux.

Les résultats d'une expérience d'induction de 24 et 48 heures effectuée sur les cellules EB-1 et EB-V325 sont présentés dans la Figure 17. Dans ces conditions les cellules exprimant la protéine p53 sauvage ou son 15 variant V-325 (détectés par l'anticorps pAb240) sont majoritairement réparties en phase G1 et sub-G1 (apoptose) après 24 heures d'induction, puis essentiellement en sub-G1 après 48 heures. Ce résultat indique clairement que la protéine V-325 est capable, tout comme la protéine p53 sauvage, d'induire l'apoptose.

20 Les résultats d'une expérience cinétique d'induction effectuée sur les cellules EB et les clones EB-1 et EB-V325 présentés dans la figure 18 montrent que le variant V-325 semble induire plus rapidement et plus massivement l'apoptose que la protéine p53 sauvage. En tenant compte du fait que les deux protéines semblent être exprimées à des niveaux 25 comparables dans ces clones (cf § D1), ce résultat conforte l'idée d'une activité améliorée du variant V-325 par rapport à celle de la protéine p53 sauvage.

## LISTE DE SEQUENCES

## 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, AVENUE RAYMOND ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165
- (G) TELEPHONE: (1) 40.91.69.22
- (H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.91

10

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Variants de la protéine p53 et utilisations thérapeutiques

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 46

20

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

25

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

30

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 112 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

40

(iv) ANTI-SENS: NON

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGATCTGAAG GCCCTCAAGG AGAAGCTGAA GGCCCTGGAG GAGAAGCTGA AGGCCCTGGA 60

GGAGAAGCTG AAGGCCTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC GATATCGCGG CC 112

50

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

55

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 266 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC  
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON  
 5 (iv) ANTI-SENS: NON

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AAGCTTGAAT	TCGTTAACAT	GTCCACGGCC	CCCCCGACCG	ATGTCAGCCT	GGGGGACGAG	60
CTCCACTTAG	ACGGCGAGGA	CGTGGCGATG	GCGCATGCCG	ACGCGCTAGA	CGATTCGAT	120
15 CTGGACATGT	TGGGGGACGG	GGATTCCCCG	GGGCCGGGAT	TTACCCCCCA	CGACTCCGCC	180
CCCTACGGCG	CTCTGGATAT	GGCCGACTTC	GAGTTTGAGC	AGATGTTAC	CGATGCCCTT	240
20 GGAATTGACG	AGTACGGTGG	TCGACC				266

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 76 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire  
 30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC  
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON  
 35 (iv) ANTI-SENS: NON

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCGAGCCTGC	AGCCTAGAGC	CTTCCAAGCC	CTCATGAAGG	AGGAAAGCCC	AAACTGCTAG	60
45 TGAGGATCCG	CGGCCCG					76

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 788 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire  
 55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC  
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON  
 (iv) ANTI-SENS: NON

## 5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGGAAGCTTG	GGCCGGTCTG	ACCTGCACCA	GCAGCTCCTA	CACCGGGCGC	CCCTGCACCA	60
10 GCCCCCTCCT	GGCCCTGTC	ATCTTCTGTC	CCTTCCCAGA	AAACCTACCA	GGGCAGCTAC	120
GGTTTCCGTC	TGGGCTTCTT	GCATTCTGGG	ACAGCCAAGT	CTGTGACTTG	CACGTACTCC	180
CCTGCCCTCA	ACAAGATGTT	TTGCCAACTG	GCCAAGACCT	GCCCTGTGCA	GCTGTGGGTT	240
15 GATTCCACAC	CCCCGCCCGG	CACCCGGCTC	CGCGCCATGG	CCATCTACAA	GCAGTCACAG	300
CACATGACGG	AGGTTGTGAG	GCGCTGCC	CACCATGAGC	GCTGCTCAGA	TAGCGATGGT	360
20 CTGGCCCCTC	CTCAGCATCT	TATCCGAGTG	GAAGGAAATT	TGCGTGTGGA	GTATTTGGAT	420
GACAGAAACA	CTTTTCGACA	TAGTGTGGTG	GTGCCCTATG	AGCCGCCTGA	GGTTGGCTCT	480
GAUTGTACCA	CCATCCACTA	CAACTACATG	TGTAACAGTT	CCTGCATGGG	CGGCATGAAC	540
25 CGGAGGCCCA	TCCTCACCAT	CATCACACTG	GAAGACTCCA	GTGGTAATCT	ACTGGGACGG	600
AACAGCTTTG	AGGTGCGTGT	TTGTGCCTGT	CCTGGGAGAG	ACCGGCGCAC	AGAGGAAGAG	660
30 AATCTCCGCA	AGAAAGGGGA	GCCTCACAC	GAGCTGCC	CAGGGAGCAC	TAAGCGAGCA	720
CTGCCCAACA	ACACCAGCTC	CTCTCCCCAG	CCAAAGAAGA	AACCACGTGA	TGGGGATCCG	780
CGGCCGCC						788

## 35 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 821 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON

50

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

55 GGGAAAGCTTG	GGCCGGTCTG	ACCTGCACCA	GCAGCTCCTA	CACCGGGCGC	CCCTGCACCA	60
GCCCCCTCCT	GGCCCTGTC	ATCTTCTGTC	CCTTCCCAGA	AAACCTACCA	GGGCAGCTAC	120
GGTTTCCGTC	TGGGCTTCTT	GCATTCTGGG	ACAGCCAAGT	CTGTGACTTG	CACGTACTCC	180

	CCTGCCCTCA ACAAGATGTT TTGCCAACTG GCCAAGACCT GCCCTGTGCA GCTGTGGTT	240
5	GATTCCACAC CCCCGCCCGG CACCCGCGTC CGGCCATGG CCATCTACAA GCAGTCACAG	300
	CACATGACGG AGGTTGTGAG GCGCTGCCCG CACCATGAGC GCTGCTCAGA TAGCGATGGT	360
	CTGGCCCTC CTCAGCATCT TATCCGAGTG GAAGGAAATT TGCCTGTGGA GTATTTGGAT	420
10	GACAGAAACA CTTTCGACA TAGTGTGGTG GTGCCCTATG AGCCGCCTGA GGTTGGCTCT	480
	GAATGTACCA CCATCCACTA CAACTACATG TGTAACAGTT CCTGCATGGG CGGCATGAAC	540
15	CGGAGGCCCA TCCTCACCAT CATCACACTG GAAGACTCCA GTGGTAATCT ACTGGGACGG	600
	AACAGCTTTG AGGTGCGTGT TTGTGCCTGT CCTGGGAGAG ACCGGCGCAC AGAGGAAGAG	660
	AATCTCCGCA AGAAAGGGGA GCCTCACAC GAGCTGCCCG CAGGGAGCAC TAAGCGAGCA	720
20	CTGCCCAACA ACACCAGCTC CTCTCCCCAG CCAAAGAAGA AACCACTGGA TGGAGAATAT	780
	TTCACCCCTTC AGATCCGTGG GCGTGAGGAT CCGCGGCCGC C	821

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 15 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

45 ATGGAGGAGC CGCAG

15

45

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGCGGCCGCG ATATCGATTC ATCAGTCTGA GTCAGGCCCT TC

42

10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

20 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGCGGCCGCG ATATCGATTC ATCAGCTCGA GTGAGC

36

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 43 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

40

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

45

(iv) ANTI-SENS: NON

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TCGAGCCTGC AGCCTAGAGC CTTCCAAGCC CTCATGAAGG AGG

43

55

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

5 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AAAGCCAAA CTGCTGATGA ATCGATATCG C

31

15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

35

TGAGGGCTTG GAAGGCTCTA GGCTGCAGGC

30

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

50

(iv) ANTI-SENS: NON

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GGCCGCGATA TCGATTCTAC AGCAGTTGG GCTTCCTCC TTCA

44

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 39 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

15 (iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

20 GGGAGCTTG GGCGGGTCG ACCTGCACCA GCAGCTCCT

39

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 32 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35 (iv) ANTI-SENS: NON

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GGCGGCCGCG GATCCCCATC CAGTGGTTTC TT

32

## 45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 15 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

55 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

5 ATCTGAATGG CGCTC

15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 32 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC  
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON  
 20 (iv) ANTI-SENS: NON

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

GGCGGGCCGCG GATCCTCACG CCCACGGATC TG

32

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:  
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 39 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 35 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire  
 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC  
 40 (iii) HYPOTHETIQUE: NON  
 (iv) ANTI-SENS: NON

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

AAGCTTGAAT TCGTTAACAT GTCCACGGCC CCCCCGACC

39

50

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

      (iii) HYPOTHETIQUE: NON

5      (iv) ANTI-SENS: NON

10      (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

GGTCGACCAC CGTACTCGTC AAT

23

15      (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

      (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

      (A) LONGUEUR: 33 paires de bases

      (B) TYPE: nucléotide

20      (C) NOMBRE DE BRINS: simple

      (D) CONFIGURATION: linéaire

      (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

25      (iii) HYPOTHETIQUE: NON

      (iv) ANTI-SENS: NON

30

      (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

GATCTGAAGG CCCTCAAGGA GAAGCTGAAG GCC

33

35

      (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

      (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

40      (A) LONGUEUR: 36 paires de bases

      (B) TYPE: nucléotide

      (C) NOMBRE DE BRINS: simple

      (D) CONFIGURATION: linéaire

45

      (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

      (iii) HYPOTHETIQUE: NON

50

      (iv) ANTI-SENS: NON

      (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

55

CTGGAGGAGA AGCTGAAGGC CCTGGAGGAG AAGCTG

36

      (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 38 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

15 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

20 AAGGCACTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC GATATCGC 38

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 42 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35 (iv) ANTI-SENS: NON

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

45 AAGGCACTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC GATATCGC 38

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 42 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

50 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

55 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

5 TAGTGCCTTC AGCTTCTCCT CCAGGGCCTT CAGCTT 36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 33 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON  
 (iv) ANTI-SENS: NON

20

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

GGCCGCGATA TCGATTCAATC ATCGCTCCCC CAC 33

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:  
 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 1095 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc  
 (iii) HYPOTHETIQUE: NON  
 (iv) ANTI-SENS: NON

40 (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMPLACEMENT: 1..1095

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

50 ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC 48  
 Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His  
 1 5 10 15

55 TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT 96  
 Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp  
 20 25 30

TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT 144

	Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe		
	35	40	45
5	ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC		192
	Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe		
	50	55	60
10	GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT		240
	Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly		
	65	70	75
15	GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC		288
	Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala		
	85	90	95
20	CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG		336
	Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln		
	100	105	110
25	GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG		384
	Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys		
	115	120	125
30	TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA		432
	Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln		
	130	135	140
35	CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG		480
	Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro		
	145	150	155
40	CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC		528
	Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His		
	165	170	175
45	ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT		576
	Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp		
	180	185	190
50	AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT		624
	Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn		
	195	200	205
55	TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT CGA CAT AGT GTG		672
	Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val		
	210	215	220
60	GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC		720
	Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile		
	225	230	235
65	CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG		768
	His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg		
	245	250	255
70	AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA		816
	Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu		
	260	265	270

CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA	864	
Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg		
275															285		
5	GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	912
	Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu										
	290				Asn	Leu	Arg	Lys								300	
10	CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	960
	His	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	
	305															320	
15	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	GGG	GAT	CTG	AAG	1008
	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Asp	Leu	
	325															335	
	GCC	CTC	AAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG		1056
	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Leu	Ala	Leu	
20	340															350	
	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCA	CTA	GTG	GGG	GAG	CGA	TGA	TGA				1095
	Glu	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Leu	Val	Gly	Glu	Arg	*	*				
	355															365	
25	(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:																
	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:																
30	(A) LONGUEUR: 1128 paires de bases																
	(B) TYPE: nucléotide																
	(C) NOMBRE DE BRINS: simple																
	(D) CONFIGURATION: linéaire																
35	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC																
	(iii) HYPOTHETIQUE: NON																
	(iv) ANTI-SENS: NON																
40	(ix) CARACTERISTIQUE:																
	(A) NOM/CLE: CDS																
	(B) EMPLACEMENT: 1..1128																
45	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:																
	ATG	TCC	ACG	GCC	CCC	CCG	ACC	GAT	GTC	AGC	CTG	GGG	GAC	GAG	CTC	CAC	48
50	Met	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	His	
	370															380	
	TTA	GAC	GGC	GAG	GAC	GTG	GCG	ATG	GCG	CAT	GCC	GAC	GCG	CTA	GAC	GAT	96
	Leu	Asp	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Met	Ala	His	Ala	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	
55	385															395	
	TTC	GAT	CTG	GAC	ATG	TTG	GGG	GAC	GGG	GAT	TCC	CCG	GGG	CCG	GGA	TTT	144
	Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Phe	
	400															410	

192	ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe 415 420 425
240	5 GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly 430 435 440 445
288	10 GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala 450 455 460
336	15 CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln 465 470 475
384	GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys 480 485 490
432	20 TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln 495 500 505
480	25 CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro 510 515 520 525
528	30 CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His 530 535 540
576	35 ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp 545 550 555
624	40 AGC GAT GGT CTG GCC CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn 560 565 570
672	45 TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT CGA CAT AGT GTG Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val 575 580 585
720	50 GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile 590 595 600 605
768	55 CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg 610 615 620
816	AGG CCC ATC CTC ACC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu 625 630 635
864	60 CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg 640 645 650

	GAC CGG CGC ACA GCA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC	912
	Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His	
5	655 660 665	
	CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC	960
	His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr	
	670 675 680 685	
10	AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA TAT TTC	1008
	Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe	
	690 695 700	
15	ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG	1056
	Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Asp Leu Lys Ala Leu Lys Glu Lys	
	705 710 715	
20	CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG	1104
	Leu Lys Ala Leu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys	
	720 725 730	
25	GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA	1128
	Ala Leu Val Gly Glu Arg * *	
	735 740	
(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:		
30	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:	
	(A) LONGUEUR: 765 paires de bases	
	(B) TYPE: nucléotide	
	(C) NOMBRE DE BRINS: simple	
	(D) CONFIGURATION: linéaire	
35	(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC	
	(iii) HYPOTHETIQUE: NON	
40	(iv) ANTI-SENS: NON	
	(ix) CARACTERISTIQUE:	
	(A) NOM/CLE: CDS	
	(B) EMPLACEMENT: 1..765	
45	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:	
50	ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC	48
	Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His	
	380 385 390	
55	TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT	96
	Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp	
	395 400 405	
	TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT	144
	Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	
	410 415 420	

5	ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe 425 430 435 440	192
10	GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly 445 450 455	240
15	GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala 460 465 470	288
20	CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln 475 480 485	336
25	GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys 490 495 500	384
30	TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln 505 510 515 520	432
35	CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro 525 530 535	480
40	CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His 540 545 550	528
45	ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp 555 560 565	576
50	AGC GAT GGT CTG GCC CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn 570 575 580	624
55	TTG CGT GTG GAG TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC Leu Arg Val Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe 585 590 595 600	672
60	GAG ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln 605 610 615	720
65	GCT GGG AAG GAG CCA GGG GGG AGC AGG GCT CAC TCG AGC TGA TGA Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser * *	765
70	620 625 630	
75	(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:	
80	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE: (A) LONGUEUR: 816 paires de bases (B) TYPE: nucléotide	

(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

10 (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMPLACEMENT:1..816

15 15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC	48
Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His	
260 265 270	
TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT	96
Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp	
275 280 285	
TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT	144
Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	
290 295 300	
ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC	192
Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe	
305 310 315	
GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT	240
Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly	
320 325 330 335	
GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC	288
Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala	
340 345 350 350	
CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG	336
Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln	
355 360 365 365	
GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG	384
Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys	
370 375 380 380	
TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA	432
Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln	
385 390 395 395	
CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG	480
Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro	
400 405 410 415	
CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC	528
Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His	

	420	425	430	
5	ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp 435 440 445			576
10	AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn 450 455 460			624
15	TTG CGT GTG GAG TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC Leu Arg Val Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe 465 470 475			672
20	GAG ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln 480 485 490 495			720
25	GCT GGG AAG GAG CCA GGG GGG AGC AGG GCT CAC TCG AGC CTG CAG CCT Ala Gly Lys Glu Pro Gly Ser Arg Ala His Ser Ser Leu Gln Pro 500 505 510			768
	AGA GCC TTC CAA GCC CTC ATG AAG GAG GAA AGC CCA AAC TGC TGA TGA Arg Ala Phe Gln Ala Leu Met Lys Glu Glu Ser Pro Asn Cys * * 515 520 525			816

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

30	(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE: (A) LONGUEUR: 1209 paires de bases (B) TYPE: nucléotide (C) NOMBRE DE BRINS: simple (D) CONFIGURATION: linéaire	
35	*(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC (iii) HYPOTHETIQUE: NON	
40	(iv) ANTI-SENS: NON	
45	(ix) CARACTERISTIQUE: (A) NOM/CLE: CDS (B)EMPLACEMENT:1..1209	
	(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:	
50	ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His 275 280 285	48
55	TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp 290 295 300	96
	TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	144

	305	310	315	320	
5	ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe 325 330 335				192
10	GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly 340 345 350				240
15	GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala 355 360 365				288
20	CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln 370 375 380				336
25	GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys 385 390 395 400				384
30	TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln 405 410 415				432
35	CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro 420 425 430				480
40	CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His 435 440 445				528
45	ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp 450 455 460				576
50	AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn 465 470 475 480				624
55	TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT CGA CAT AGT GTG Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val 485 490 495				672
60	GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile 500 505 510				720
65	CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg 515 520 525				768
70	AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu 530 535 540				816
	CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA				864

	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	
	545					550					555					560	
5	GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	912
	Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	
				565					570		575						
10	CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	960
	His	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	
				580					585		590						
15	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	1008
	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr	Phe	
				595					600		605						
20	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	1056
	Thr	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Phe	Glu	Met	Phe	Arg	Glu	Leu	
				610					615		620						
25	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	GGG	AAG	GAG	CCA	GGG	1104
	Asn	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly	
				625					630		635				640		
30	GGG	AGC	AGG	GCT	CAC	TCC	AGC	CAC	CTG	AAG	TCC	AAA	AAG	GGT	CAG	TCT	1152
	Gly	Ser	Arg	Ala	His	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	
				645					650		655						
35	ACC	TCC	CGC	CAT	AAA	AAA	CTC	ATG	TTC	AAG	ACA	GAA	GGG	CCT	GAC	TCA	1200
	Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Leu	Met	Phe	Lys	Thr	Glu	Gly	Pro	Asp	Ser	
				660					665		670						
	GAC	TGA	TGA														1209
	Asp	*	*														
				675													

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 1149 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- 45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- 50 (iv) ANTI-SENS: NON
- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: CDS
  - (B) EMPLACEMENT: 1..1149
- 55 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:
  - ATG
  - GCC
  - ACG
  - GCC
  - CCC
  - CCG
  - ACC
  - GAT
  - GTC
  - AGC
  - CTG
  - GGG
  - GAC
  - GAG
  - CTC
  - CAC

	Met Ala Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His	
1	1	10
5	5	15
	TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT	96
	Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp	
	20 25 30	
10	TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT	144
	Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	
	35 40 45	
	ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC	192
	Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe	
	50 55 60	
15	GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT	240
	Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly	
	65 70 75 80	
20	GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC	288
	Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala	
	85 90 95	
25	CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG	336
	Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln	
	100 105 110	
30	GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG	384
	Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys	
	115 120 125	
	TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA	432
	Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln	
	130 135 140	
35	CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG	480
	Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro	
	145 150 155 160	
40	CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC	528
	Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His	
	165 170 175	
45	ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT	576
	Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp	
	180 185 190	
50	AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT	624
	Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn	
	195 200 205	
	TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT CGA CAT AGT GTG	672
	Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val	
	210 215 220	
55	GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC	720
	Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile	
	225 230 235 240	

	CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG	768
	His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg	
	245 250 255	
5	AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA	816
	Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu	
	260 265 270	
10	CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA	864
	Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg	
	275 280 285	
15	GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC	912
	Asp Arg Arg Thr Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His	
	290 295 300	
20	CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC	960
	His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr	
	305 310 315 320	
25	AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA TAT TTC	1008
	Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe	
	325 330 335	
30	ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC GAG ATG TTC CGA GAG GAT	1056
	Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Asp	
	340 345 350	
35	CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG	1104
	Leu Lys Ala Leu Lys Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys	
	355 360 365	
	GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA	1149
	Ala Leu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Val Gly Glu Arg * *	
	370 375 380	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

40 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 1611 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

45 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

50 (IV) ANTI-SENS: NON

(IX) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMPLACEMENT: 1..1611

## (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

ATG	GCC	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCA	GGG	GCA	GAG	CTT	GTG	GGG	TCA	48	
MET	ALA	GLN	VAL	GLN	LEU	GLN	SER	GLY	ALA	GLU	LEU	VAL	GLY	SER			
1				5					10				15				
5	GGG	GCC	TCA	GTC	AAG	TTG	TCC	TGC	ACA	GCT	TCT	GGC	TTC	AAC	ATT	AAA	96
GLY	ALA	SER	VAL	LYS	LEU	SER	CYS	THR	ALA	SER	GLY	PHE	ASN	ILE	LYS		
20				25					30								
10	GAC	TAC	TAT	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GAA	CAG	GGC	CTG	GAG	144
ASP	TYR	TYR	MET	HIS	TRP	VAL	LYS	GLN	ARG	PRO	GLU	GLN	GLY	LEU	GLU		
35				40					45								
15	TGG	ATT	GGA	TGG	ATT	GAT	CCT	GAG	AAT	GGT	GAT	ACT	GAA	TAT	GCC	CCG	192
TRP	ILE	GLY	TRP	ILE	ASP	PRO	GLU	ASN	GLY	ASP	THR	GLU	TYR	ALA	PRO		
50	55			60													
20	AAG	TTC	CAG	GGC	AAG	GCC	ACT	ATG	ACT	GCA	GAC	ACA	TCC	TCC	AAT	ACA	240
LYS	PHE	GLN	GLY	LYS	ALA	THR	MET	THR	ALA	ASP	THR	SER	SER	ASN	THR		
65	70			75					80								
25	GCC	TAC	CTG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	GCA	TCT	GAG	GAC	ACT	GCC	GTC	TAT	288
ALA	TYR	LEU	GLN	LEU	SER	SER	LEU	ALA	SER	GLU	ASP	THR	ALA	VAL	TYR		
85				90					95								
30	TAT	TGT	AAT	TTT	TAC	GGG	GAT	GCT	TTG	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	336
TYR	CYS	ASN	PHE	TYR	GLY	ASP	ALA	LEU	ASP	TYR	TRP	GLY	GLN	GLY	THR		
100				105					110								
35	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	384
THR	VAL	THR	VAL	SER	SER	GLY	GLY	GLY	GLY	GLY	GLY	SER	GLY	GLY	GLY	SER	
115				120					125								
40	GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	GAT	GTT	TTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTC	ACT	TTG	432
GLY	SER	ASP	VAL	LEU	MET	THR	GLN	THR	PRO	LEU							
130				135					140								
45	TCG	GTT	ACC	ATT	GGA	CAA	CCA	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	480
SER	VAL	THR	ILE	GLY	GLN	PRO	ALA	SER	ILE	SER	CYS	LYS	SER	SER	GLN		
145				150					155				160				
50	AGC	CTC	TTG	GAT	AGT	GAT	GGA	AAG	ACA	TAT	TTG	AAT	TGG	TTG	TTA	CAG	528
SER	LEU	LEU	ASP	SER	ASP	GLY	LYS	THR	TYR	LEU	ASN	TRP	LEU	LEU	GLN		
165				170					175								
55	AGG	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CGC	CTA	ATC	TAT	CTG	GTG	TCT	AAA	CTG	576
ARG	PRO	GLY	GLN	SER	PRO	LYS	ARG	LEU	ILE	TYR	LEU	VAL	SER	LYS	LEU		
180				185					190								
60	GAC	TCT	GGA	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	ACT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	GAT	624
ASP	SER	GLY	VAL	PRO	ASP	ARG	PHE	THR	GLY	SER	GLY	SER	GLY	THR	ASP		
195				200					205								
65	TTC	ACA	CTG	AAA	ATC	AAC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	TTG	GGA	GTT	TAT	672
PHE	THR	LEU	LYS	ILE	ASN	ARG	VAL	ALA	GLU	ASP	LEU	GLY	VAL	TYR			
210				215					220								
70	TAT	TGC	TGG	CAA	GGT	ACA	CAT	TCT	CCG	CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	720
TYR	CYS	TRP	GLN	GLY	THR	HIS	SER	PRO	LEU	THR	PHE	GLY	ALA	GLY	THR		
225				230					235				240				

	AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCG GCC GCA TTG CAG ACG CGT CGA CCT GCA LYS LEU GLU LEU LYS ARG ALA ALA ALA LEU GLN THR ARG ARG PRO ALA 245 250 255	768
5	CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC CCC TCC TGG CCC PRO ALA ALA PRO THR PRO ALA ALA PRO ALA PRO ALA PRO SER TRP PRO 260 265 270	816
10	CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG GGC AGC TAC GGT LEU SER SER SER VAL PRO SER GLN LYS THR TYR GLN GLY SER TYR GLY 275 280 285	864
15	TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG TCT GTG ACT TGC PHE ARG LEU GLY PHE LEU HIS SER GLY THR ALA LYS SER VAL THR CYS 290 295 300	912
20	ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA CTG GCC AAG ACC THR TYR SER PRO ALA LEU ASN LYS MET PHE CYS GLN LEU ALA LYS THR 305 310 315 320	960
	TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC CYS PRO VAL GLN LEU TRP VAL ASP SER THR PRO PRO GLY THR ARG 325 330 335	1008
25	GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT VAL ARG ALA MET ALA ILE TYR LYS GLN SER GLN HIS MET THR GLU VAL 340 345 350	1056
30	GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG VAL ARG ARG CYS PRO HIS HIS GLU ARG CYS SER ASP SER ASP GLY LEU 355 360 365	1104
35	GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG ALA PRO PRO GLN HIS LEU ILE ARG VAL GLU GLY ASN LEU ARG VAL GLU 370 375 380	1152
40	TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT CGA CAT AGT GTG GTG GTG CCC TAT TYR LEU ASP ASP ARG ASN THR PHE ARG HIS SER VAL VAL VAL PRO TYR 385 390 395 400	1200
	GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC GLU PRO PRO GLU VAL GLY SER ASP CYS THR THR ILE HIS TYR ASN TYR 405 410 415	1248
45	ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC MET CYS ASN SER SER CYS MET GLY GLY MET ASN ARG ARG PRO ILE LEU 420 425 430	1296
50	ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC THR ILE ILE THR LEU GLU ASP SER SER GLY ASN LEU LEU GLY ARG ASN 435 440 445	1344
55	AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA SER PHE GLU VAL ARG VAL CYS ALA CYS PRO GLY ARG ASP ARG ARG THR 450 455 460	1392
	GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC GLU GLU GLU ASN LEU ARG LYS LYS GLY GLU PRO HIS HIS GLU LEU PRO	1440

465	470	475	480	
CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC PRO GLY SER THR LYS ARG ALA LEU PRO ASN ASN THR SER SER SER PRO				1488
5	485	490	495	
.CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG GLN PRO LYS LYS PRO LEU ASP GLY ASP LEU LYS ALA LEU LYS GLU				1536
10	500	505	510	
AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU				1584
	515	520	525	
15	AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA LYS ALA LEU VAL GLY GLU ARG * *			1611
	530	535		
20	(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:			
	(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:			
25	(A) LONGUEUR: 1065 paires de bases (B) TYPE: nucléotide (C) NOMBRE DE BRINS: simple (D) CONFIGURATION: linéaire			
	(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC			
30	(III) HYPOTHETIQUE: NON			
	(IV) ANTI-SENS: NON			
35	(IX) CARACTERISTIQUE:			
	(A) NOM/CLE: CDS (B) EMPLACEMENT: 1..1065			
40	(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:			
	ATG GGA GAA TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC GAG MET GLY GLU TYR PHE THR LEU GLN ILE ARG GLY ARG GLU ARG PHE GLU			
	1	5	10	15
45	ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG GCT MET PHE ARG GLU LEU ASN GLU ALA LEU GLU LEU LYS ASP ALA GLN ALA			
	20	25	30	
50	GGG AAG GAG CCA GGG GGG AGC AGG GCT CAC TCC AGC CAC CTG AAG TCC GLY LYS GLU PRO GLY GLY SER ARG ALA HIS SER SER HIS LEU LYS SER			
	35	40	45	
55	AAA AAG GGT CAG TCT ACC TCC CGC CAT AAA AAA CTC ATG TTC AAG ACA LYS LYS GLY GLN SER THR SER ARG HIS LYS LYS LEU MET PHE LYS THR			
	50	55	60	
GAA GGG CCT GAC TCA GAC GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GLU GLY PRO ASP SER ASP GLY ARG PRO ALA PRO ALA PRO THR PRO				240

	65	70	75	80	
5	GCG GCC CCT GCA CCA GCC CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT ALA ALA PRO ALA PRO ALA PRO SER TRP PRO LEU SER SER SER VAL PRO 85 90 95				288
10	TCC CAG AAA ACC TAC CAG GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG SER GLN LYS THR TYR GLN GLY SER TYR GLY PHE ARG LEU GLY PHE LEU 100 105 110				336
15	CAT TCT GGG ACA GCC AAG TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC HIS SER GLY THR ALA LYS SER VAL THR CYS THR TYR SER PRO ALA LEU 115 120 125				384
20	AAC AAG ATG TTT TGC CAA CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG ASN LYS MET PHE CYS GLN LEU ALA LYS THR CYS PRO VAL GLN LEU TRP 130 135 140				432
25	GTT GAT TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC VAL ASP SER THR PRO PRO GLY THR ARG VAL ARG ALA MET ALA ILE 145 150 155 160				480
30	TAC AAG CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC TYR LYS GLN SER GLN HIS MET THR GLU VAL VAL ARG ARG CYS PRO HIS 165 170 175				528
35	CAT GAG CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT HIS GLU ARG CYS SER ASP SER ASP GLY LEU ALA PRO PRO GLN HIS LEU 180 185 190				576
40	ATC CGA GTG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ILE ARG VAL GLU GLY ASN LEU ARG VAL GLU TYR LEU ASP ASP ARG ASN 195 200 205				624
45	ACT TTT CGA CAT AGT GTG GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC THR PHE ARG HIS SER VAL VAL VAL PRO TYR GLU PRO PRO GLU VAL GLY 210 215 220				672
50	TCT GAC TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC SER ASP CYS THR THR ILE HIS TYR ASN TYR MET CYS ASN SER SER CYS 225 230 235 240				720
55	ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA MET GLY GLY MET ASN ARG ARG PRO ILE LEU THR ILE ILE THR LEU GLU 245 250 255				768
60	GAC TCC AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT ASP SER SER GLY ASN LEU LEU GLY ARG ASN SER PHE GLU VAL ARG VAL 260 265 270				816
65	TGT GCC TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC CYS ALA CYS PRO GLY ARG ASP ARG ARG THR GLU GLU ASN LEU ARG 275 280 285				864
70	AAG AAA GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA LYS LYS GLY GLU PRO HIS HIS GLU LEU PRO PRO GLY SER THR LYS ARG 290 295 300				912
75	GCA CTG CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA				960

ALA	LEU	PRO	ASN	ASN	THR	SER	SER	SER	PRO	GLN	PRO	LYS	LYS	LYS	PRO		
305										310		315			320		
5	CTG	GAT	GGG	GAT	CTG	AAG	GCC	CTC	AAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	1008
	LEU	ASP	GLY	ASP	LEU	LYS	ALA	LEU	LYS	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	GLU	
						325					330					335	
10	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCA	CTA	GTG	GGG	GAG	1056
	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	GLU	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	VAL	GLY	GLU	
						340					345					350	
15	CGA	TGA	TGA														1065
	ARG	*	*														
			355														
	(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:																
20	(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:																
	(A)	LONGUEUR: 963 paires de bases															
	(B)	TYPE: nucléotide															
	(C)	NOMBRE DE BRINS: simple															
	(D)	CONFIGURATION: linéaire															
25	(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC																
	(III) HYPOTHETIQUE: NON																
30	(IV) ANTI-SENS: NON																
35	(IX) CARACTERISTIQUE:																
	(A)	NOM/CLE: CDS															
	(B)	EMPLACEMENT: 1..963															
	(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:																
40	ATG	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	48
	MET	GLY	GLU	TYR	PHE	THR	LEU	GLN	ILE	ARG	GLY	ARG	GLU	ARG	PHE	GLU	
	1				5				10						15		
45	ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	96
	MET	PHE	ARG	GLU	LEU	ASN	GLU	ALA	LEU	GLU	LEU	LYS	ASP	ALA	GLN	ALA	
					20				25						30		
50	GGG	AAG	GAG	CCA	GGT	CGA	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	144
	GLY	LYS	GLU	PRO	GLY	ARG	PRO	ALA	PRO	ALA	ALA	PRO	THR	PRO	ALA	ALA	
						35			40				45				
55	CCT	GCA	CCA	GCC	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	192
	PRO	ALA	PRO	ALA	PRO	SER	TRP	PRO	LEU	SER	SER	SER	VAL	PRO	SER	GLN	
						50			55				60				
60	AAA	ACC	TAC	CAG	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	
	LYS	THR	TYR	GLN	GLY	SER	TYR	GLY	ARG	LEU	GLY	PHE	LEU	HIS	SER		
						65			70			75		80			
65	GGG	ACA	GCC	AAG	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	288

	GLY THR ALA LYS SER VAL THR CYS THR TYR SER PRO ALA LEU ASN LYS			
	85	90	95	
5	ATG TTT TGC CAA CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT MET PHE CYS GLN LEU ALA LYS THR CYS PRO VAL GLN LEU TRP VAL ASP		336	
	100	105	110	
10	TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG SER THR PRO PRO PRO GLY THR ARG VAL ARG ALA MET ALA ILE TYR LYS		384	
	115	120	125	
15	CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG GLN SER GLN HIS MET THR GLU VAL VAL ARG ARG CYS PRO HIS HIS GLU		432	
	130	135	140	
20	CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA ARG CYS SER ASP SER ASP GLY LEU ALA PRO PRO GLN HIS LEU ILE ARG		480	
	145	150	155	160
25	GTA GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT VAL GLU GLY ASN LEU ARG VAL GLU TYR LEU ASP ASP ARG ASN THR PHE		528	
	165	170	175	
30	CGA CAT AGT GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC ARG HIS SER VAL VAL VAL PRO TYR GLU PRO PRO GLU VAL GLY SER ASP		576	
	180	185	190	
35	TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC CYS THR ILE HIS TYR ASN TYR MET CYS ASN SER SER CYS MET GLY		624	
	195	200	205	
40	GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC GLY MET ASN ARG ARG PRO ILE LEU THR ILE ILE THR LEU GLU ASP SER		672	
	210	215	220	
45	AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC SER GLY ASN LEU LEU GLY ARG ASN SER PHE GLU VAL ARG VAL CYS ALA		720	
	225	230	235	240
50	TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA CYS PRO GLY ARG ASP ARG ARG THR GLU GLU ASN LEU ARG LYS LYS		768	
	245	250	255	
55	GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG GLY GLU PRO HIS HIS GLU LEU PRO PRO GLY SER THR LYS ARG ALA LEU		816	
	260	265	270	
60	CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT PRO ASN ASN THR SER SER SER PRO GLN PRO LYS LYS LYS PRO LEU ASP		864	
	275	280	285	
65	GGG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG CTG AAG GGC CTG GAG GAG AAG GLY ASP LEU LYS ALA LEU LYS GLU LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS		912	
	290	295	300	
70	CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU LYS ALA LEU VAL GLY GLU ARG *		960	
	305	310	315	320

TGA	963
-----	-----

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

10

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 1011 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

20

(III) HYPOTHETIQUE: NON  
 (IV) ANTI-SENS: NON  
 (IX) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMPLACEMENT: 1..1011

25

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

ATG	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	48
MET	GLY	GLU	TYR	PHE	THR	LEU	GLN	ILE	ARG	GLY	ARG	GLU	ARG	PHE	GLU	
30	1				5			10					15			
ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	96
MET	PHE	ARG	GLU	LEU	ASN	GLU	ALA	LEU	GLU	LEU	LYS	ASP	ALA	GLN	ALA	
35				20				25					30			
GGG	AAG	GAG	CCA	GGT	CGA	GGA	GGT	GGT	GGC	TCT	GGA	GGC	GGA	GGA	TCC	144
GLY	LYS	GLU	PRO	GLY	ARG	GLY	GLY	GLY	SER	GLY	GLY	GLY	GLY	GLY	SER	
40				35				40					45			
GGC	GGT	GGA	GGT	TCT	CGA	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	192
GLY	GLY	GLY	SER	ARG	PRO	ALA	PRO	ALA	ALA	PRO	THR	PRO	ALA	ALA		
45				50				55					60			
CCT	GCA	CCA	GCC	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	240
PRO	ALA	PRO	ALA	PRO	SER	TRP	PRO	LEU	SER	SER	SER	VAL	PRO	SER	GLN	
50				65				70					75		80	
AAA	ACC	TAC	CAG	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	288
LYS	THR	TYR	GLN	GLY	SER	TYR	GLY	PHE	ARG	LEU	GLY	PHE	LEU	HIS	SER	
55				85				90					95			
GGG	ACA	GCC	AAG	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	336
GLY	THR	ALA	LYS	SER	VAL	THR	CYS	THR	TYR	SER	PRO	ALA	LEU	ASN	LYS	
				100				105					110			
ATG	TTT	TGC	CAA	CTG	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	384
MET	PHE	CYS	GLN	LEU	ALA	LYS	THR	CYS	PRO	VAL	GLN	LEU	TRP	VAL	ASP	
				115				120					125			

	TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG	432
	SER THR PRO PRO PRO GLY THR ARG VAL ARG ALA MET ALA ILE TYR LYS	
	130 135 140	
5	CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG	480
	GLN SER GLN HIS MET THR GLU VAL VAL ARG ARG CYS PRO HIS HIS GLU	
	145 150 155 160	
10	CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA	528
	ARG CYS SER ASP SER ASP GLY LEU ALA PRO PRO GLN HIS LEU ILE ARG	
	165 170 175	
	G TG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT	576
	VAL GLU GLY ASN LEU ARG VAL GLU TYR LEU ASP ASP ARG ASN THR PHE	
15	180 185 190	
	CGA CAT AGT GTG GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC	624
	ARG HIS SER VAL VAL VAL PRO TYR GLU PRO PRO GLU VAL GLY SER ASP	
20	195 200 205	
	TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC	672
	CYS THR THR ILE HIS TYR ASN TYR MET CYS ASN SER SER CYS MET GLY	
25	210 215 220	
	GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC	720
	GLY MET ASN ARG ARG PRO ILE LEU THR ILE ILE THR LEU GLU ASP SER	
	225 230 235 240	
30	AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC	768
	SER GLY ASN LEU LEU GLY ARG ASN SER PHE GLU VAL ARG VAL CYS ALA	
	245 250 255	
35	TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA	816
	CYS PRO GLY ARG ASP ARG ARG THR GLU GLU GLU ASN LEU ARG LYS LYS	
	260 265 270	
	GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG	864
	GLY GLU PRO HIS HIS GLU LEU PRO PRO GLY SER THR LYS ARG ALA LEU	
40	275 280 285	
	CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT	912
	PRO ASN ASN THR SER SER PRO GLN PRO LYS LYS LYS PRO LEU ASP	
	290 295 300	
45	GGG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG	960
	GLY ASP LEU LYS ALA LEU LYS GLU LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS	
	305 310 315 320	
50	CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA	1008
	LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU LYS ALA LEU VAL GLY GLU ARG *	
	325 330 335	
	TGA	1011
55	*	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:

## (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

5

## (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

10 (III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

15

## (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

CGGATCCTCT CGGAACATCT CGAA

24

20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 36:

## (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 749 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

25

## (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

30

## (III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

35

## (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

40	GCCATGGCCC AGGTGCAGCT GCAGGGAGTC GGGGCAGAGC TTGTGGGTC AGGGGCCTCA	60
	GTCAAAGTTGT CCTGCACAGC TTCTGGCTTC AACATTAAG ACTACTATAT GCACTGGTG	120
45	AAGCAGAGGC CTGAACAGGG CCTGGAGTGG ATTGGATGGA TTGATCCTGA GAATGGTGAT	180
	ACTGAATATG CCCCAGAAGTT CCAGGGCAAG GCCACTATGA CTGCAGACAC ATCCTCCAAT	240
	ACAGCCTTAC TGCAGCTCAG CAGCCTGGCA TCTGAGGACA CTGCCGTCTA TTATTGTAAT	300
50	TTTTACGGGG ATGCTTGGGA CTACTGGGGC CAAGGGACCA CGGTACCCGT CTCCTCAGGT	360
	GGAGGCAGTT CAGGCGGAGG TGGCTCTGGC GGTGGCGGAT CGGATGTTTT GATGACCCAA	420
55	ACTCCACTCA CTTTGTCTGGT TACCATTGGA CAACCAGCCT CCATCTCTTG CAAGTCAAGT	480
	CAGAGCCTCT TGGATAGTGA TGGAAAGACA TATTGAAATT GGTTGTTACA GAGGCCAGGC	540
	CAGTCTCCAA AGCGCCTAAT CTATCTGGTG TCTAAACTGG ACTCTGGAGT CCCTGACAGG	600

TTCACTGGCA GTGGATCAGG GACAGATTTC AACTGAAAA TCAACAGAGT GGAGGCTGAG	660
GATTTGGAG TTTATTATTG CTGGCAAGGT ACACATTCTC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG	720
5 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG GGCGGCCGC	749

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:

10 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 45 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

15 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

20 (IV) ANTI-SENS: NON

25 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTCA CCCTT

45

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40 (III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

45

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

GGGTCGACCT GGCTCCTTCC CAGC

24

50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 39:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 749 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

5 (IV) ANTI-SENS: NON

10 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTTCA CCCTTCAGAT CCGTGGCGT 60  
15 GAGCGCTTCG AGATGTTCCG AGAGCTGAAT GAGGCCTTGG AACTCAAGGA TGCCCAGGCT 120  
GGGAAGGAGC CAGGTCGACC C 141

20 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 40:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
25 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

30 (III) HYPOTHETIQUE: NON

(IV) ANTI-SENS: NON

35

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

40 GGGTCGACCG TCTGAGTCAG GCCCTTC 27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 41:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
45 (A) LONGUEUR: 749 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

50 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(III) HYPOTHETIQUE: NON

55 (IV) ANTI-SENS: NON

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:

	AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTCA CCCTTCAGAT CCGTGGCGT	60
5	GAGCGCTTCG AGATGTTCCG AGAGCTGAAT GAGGCCTTGG AACTCAAGGA TGCCCAAGGCT	120
	GGGAAGGGAGC CAGGGGGGAG CAGGGCTCAC TCCAGCCACC TGAAGTCCAA AAAGGGTCAG	180
10	TCTACCTCCC GCCATAAAAA ACTCATGTTA AAGACAGAAG GGCCTGACTC AGACGGTCGA	240
	CCC	243

15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 42:

- (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (III) HYPOTHETIQUE: NON
- (IV) ANTI-SENS: NON

30 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:

TCGAGGAGGT GGTGGCTCTG GAGGCAGGAGG ATCCGGCGGT GGAGGTT	48
--	----

35 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 43:

- (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (III) HYPOTHETIQUE: NON
- (IV) ANTI-SENS: NON

50 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 43:

55 TCGAGAACCC CTACCGCCGG ATCCTCCGCC TCCAGAGCCA CCACCTCC	48
---	----

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 44:

**FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)**

100

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 16 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide  
(iii) HYPOTHETIQUE: non  
(v) TYPE DE FRAGMENT: interne

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 44:  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser  
1 5 10 15

20 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 45:  
25 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 26 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

30 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC  
(III) HYPOTHETIQUE: NON  
(IV) ANTI-SENS: NON

35 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 45:  
GATCCGAACA TGTCCCAACA TGTTGA 26

40 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 46:  
45 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 26 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

50 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC  
(III) HYPOTHETIQUE: NON  
(IV) ANTI-SENS: NON

55 (XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 46:  
AGCTTCAACA TGTTGGGACA TGGTCG 26

REVENDICATIONS

1. Variant de la protéine p53 dans lequel tout ou partie du domaine d'oligomérisation est déleté et remplacé par un domaine leucine zipper artificiel.
- 5 2. Variant selon la revendication 1 caractérisé en ce que la délétion comprend également tout ou partie du domaine de régulation.
3. Variant selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comporte une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 326.
4. Variant selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comporte une 10 délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 337.
5. Variant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le domaine leucine zipper artificiel est un domaine non présent à l'état naturel assurant une sélectivité d'oligomérisation.
6. Variant selon la revendication 5 caractérisé en ce que le domaine leucine 15 zipper possède la séquence SEQ ID n° 1.
7. Variant selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que le résidu arginine en position 182 de la protéine p53 est remplacé par une histidiné.
8. Variant selon l'une des revendications précédentes dans lequel tout ou 20 partie du domaine transactivateur est déleté et remplacé par un domaine transactivateur hétérologue.
9. Variant selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comporte une délétion des résidus 1 à 74.
10. Variant selon la revendication 8 ou 9 caractérisé en ce que le domaine 25 transactivateur hétérologue est le domaine transactivateur de VP16.

11. Variant selon la revendication 10 caractérisé en ce que le domaine transactivateur comporte la séquence SEQ ID n° 2.
12. Variant selon la revendication 8 ou 9 caractérisé en ce que le domaine transactivateur hétérologue est un domaine transactivateur spécifique des 5 cellules transformées.
13. Variant selon la revendication 12 caractérisé en ce que le domaine transactivateur est composé d'un domaine protéique capable de lier sélectivement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.
- 10 14. Variant de la protéine p53 actif préférentiellement dans les cellules transformées dans lequel un au moins des domaines fonctionnels de p53 est délété en tout ou en partie et est substitué par un domaine hétérologue actif préférentiellement dans les cellules transformées.
- 15 15. Variant selon la revendication 14 caractérisé en ce que le domaine fonctionnels de p53 délété et substitué est le domaine transactivateur.
16. Variant selon la revendication 15 comprenant un domaine transactivateur actif préférentiellement dans les cellules contenant une protéine ras oncogénique ou un mutant de p53.
- 20 17. Variant selon la revendication 16 caractérisé en ce que le domaine transactivateur est un domaine protéique capable de lier sélectivement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.
- 25 18. Variant selon la revendication 17 caractérisé en ce que le domaine protéique comprend un fragment ou un dérivé d'anticorps, de préférence un Fab ou un ScFv.

19. Variant selon la revendication 18 caractérisé en ce que le domaine protéique comprend un ScFv dirigé contre un mutant de la protéine p53.
20. Variant selon l'une des revendications 15 à 19 caractérisé en ce que le domaine transactivateur naturel est déleté par suppression des résidus 1 à 5 74.
21. Variant de la protéine p53 comprenant une délétion de la partie C-terminale, à partir du résidu 366, fusionné à la séquence SEQ ID n° 3 (AS).
22. Variant selon la revendication 21 dans lequel tout ou partie du domaine 10 transactivateur est déleté et remplacé par un domaine transactivateur hétérologue.
23. Variant selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que le résidu arginine en position 182 de la protéine p53 est remplacé par une histidine.
24. Protéine chimère comprenant un domaine transactivateur, un domaine de 15 liaison à l'ADN, un domaine d'adressage au noyau et un domaine d'oligomérisation, caractérisé en ce que les domaines de liaison à l'ADN et d'adressage au noyau sont constitués par les acides aminés 75 à 325 de la protéine p53 sauvage humaine (SEQ ID n° 4).
25. Protéine chimère comprenant un domaine transactivateur, un domaine de 20 liaison à l'ADN, un domaine d'adressage au noyau et un domaine d'oligomérisation, caractérisé en ce que les domaines de liaison à l'ADN et d'adressage au noyau sont constitués par les acides aminés 75 à 336 de la protéine p53 sauvage humaine (SEQ ID n° 5).
26. Protéine chimère selon la revendication 24 ou 25 caractérisée en ce que 25 le résidu arginine en position 182 de la protéine p53 est remplacé par une histidine.

27. Protéine chimère selon l'une des revendications 24 à 26 caractérisée en ce que le domaine transactivateur est constitué par le domaine transactivateur de VP16.

28. Protéine chimère selon l'une des revendications 24 à 27 caractérisée en 5 ce que le domaine transactivateur est constitué par un domaine protéique capable de lier sélectivement un transactivateur ou un complexe transactivateur présent dans une cellule transformée.

29. Protéine chimère selon l'une des revendications 24 à 28 caractérisée en ce que le domaine d'oligomérisation est constitué par un leucine zipper 10 artificiel.

30. Composé V-325 de séquence SEQ ID n° 25 et son variant V-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.

31. Composé V-336 de séquence SEQ ID n° 26 et son variant V-336H comportant une histidine en position 182 de la p53.

15 32. Composé V-367 de séquence SEQ ID n° 27 et son variant V-367H comportant une histidine en position 182 de la p53.

33. Composé V-AS de séquence SEQ ID n° 28 et son variant V-ASH comportant une histidine en position 182 de la p53.

34. Composé V-393 de séquence SEQ ID n° 29 et son variant V-393H 20 comportant une histidine en position 182 de la p53.

35. Composé V-343 de séquence SEQ ID n° 30 et son variant V-343H comportant une histidine en position 182 de la p53.

36. Composé S-325 de séquence SEQ ID n° 31 et son variant S-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.

37. Composé 393-325 de séquence SEQ ID n° 32 et son variant 393-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.
38. Composé 360-325 de séquence SEQ ID n° 33 et son variant 360-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.
- 5 39. Composé 360h-325 de séquence SEQ ID n° 34 et son variant 360h-325H comportant une histidine en position 182 de la p53.
40. Acide nucléique codant pour un variant ou une protéine chimère selon l'une des revendications 1 à 39.
41. Acide nucléique selon la revendication 40 caractérisé en ce qu'il s'agit 10 d'un ADNc, d'un ARN, d'un acide synthétique ou semi-synthétique.
42. Acide nucléique selon la revendication 40 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les acides nucléiques de séquence SEQ ID n° 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 32, 33 et 34
43. Cassette d'expression comprenant un acide nucléique selon la 15 revendication 40, un promoteur permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription.
44. Vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 40 ou une cassette selon la revendication 43.
45. Vecteur selon selon la revendication 44 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un 20 vecteur viral.
46. Vecteur selon selon la revendication 45 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus recombinant défectif.
47. Vecteur selon selon la revendication 45 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un rétrovirus recombinant défectif.

48. Vecteur selon selon la revendication 45 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un AAV recombinant défectif.

49. Vecteur selon selon la revendication 45 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un HSV recombinant défectif.

5 50. Vecteur selon selon la revendication 44 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur chimique ou biochimique.

51 Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique et ou un vecteur selon l'une des revendications 35 à 50.

52. Composition pharmaceutique comprenant un variant ou une protéine  
10 chimère selon l'une des revendications 1 à 39.

53. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 51 ou 52 pour le traitement des désordres hyperprolifératifs.

1 / 18

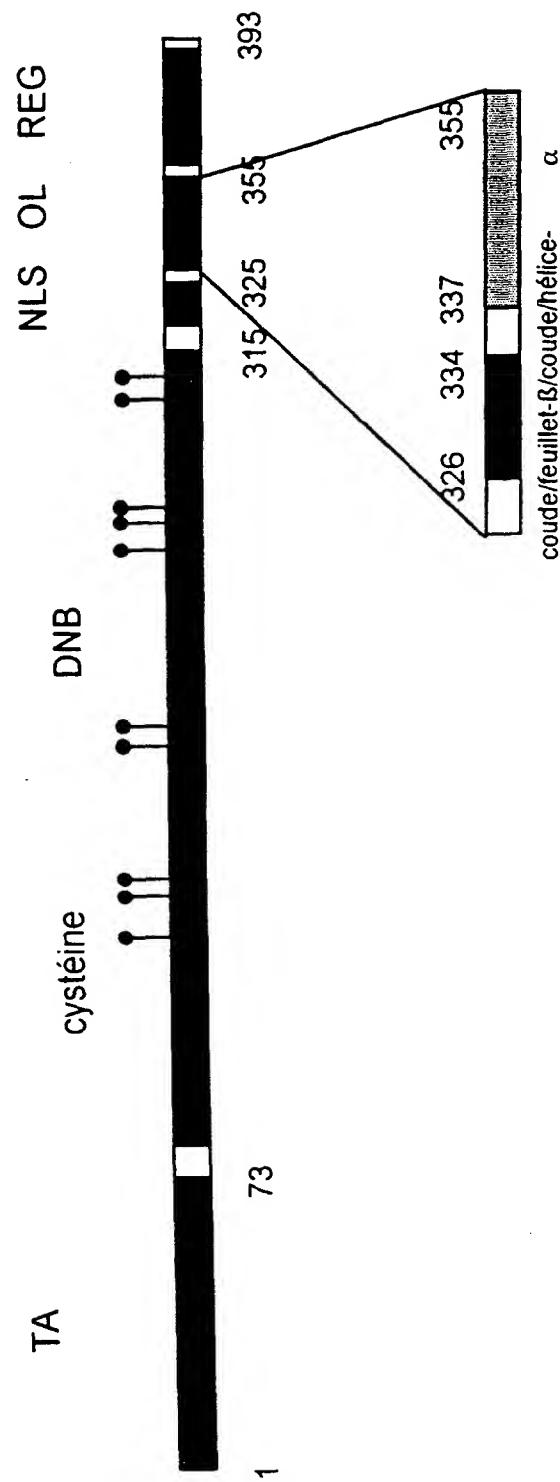


Figure 1

2 / 18

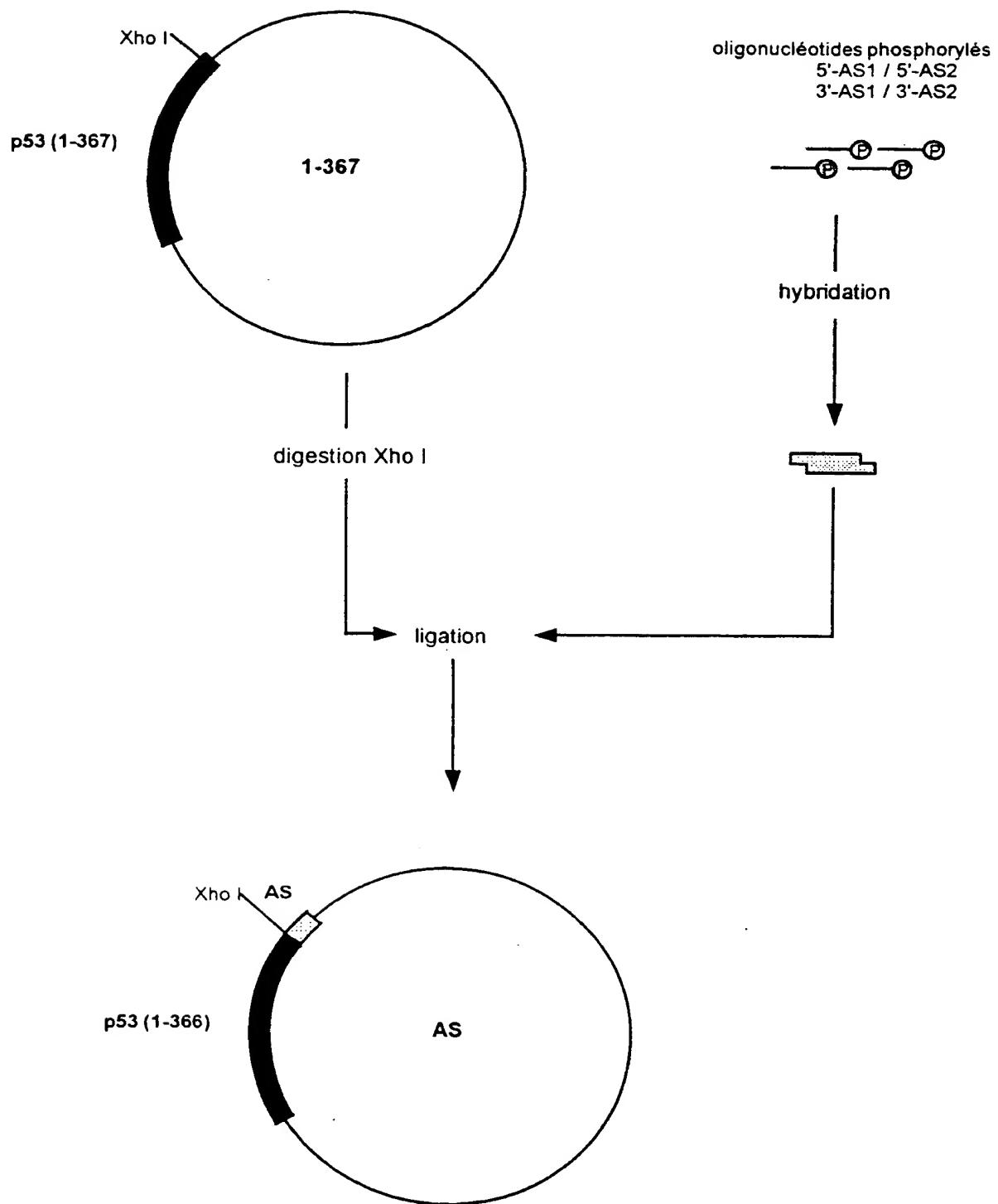


Figure 2

3 / 18

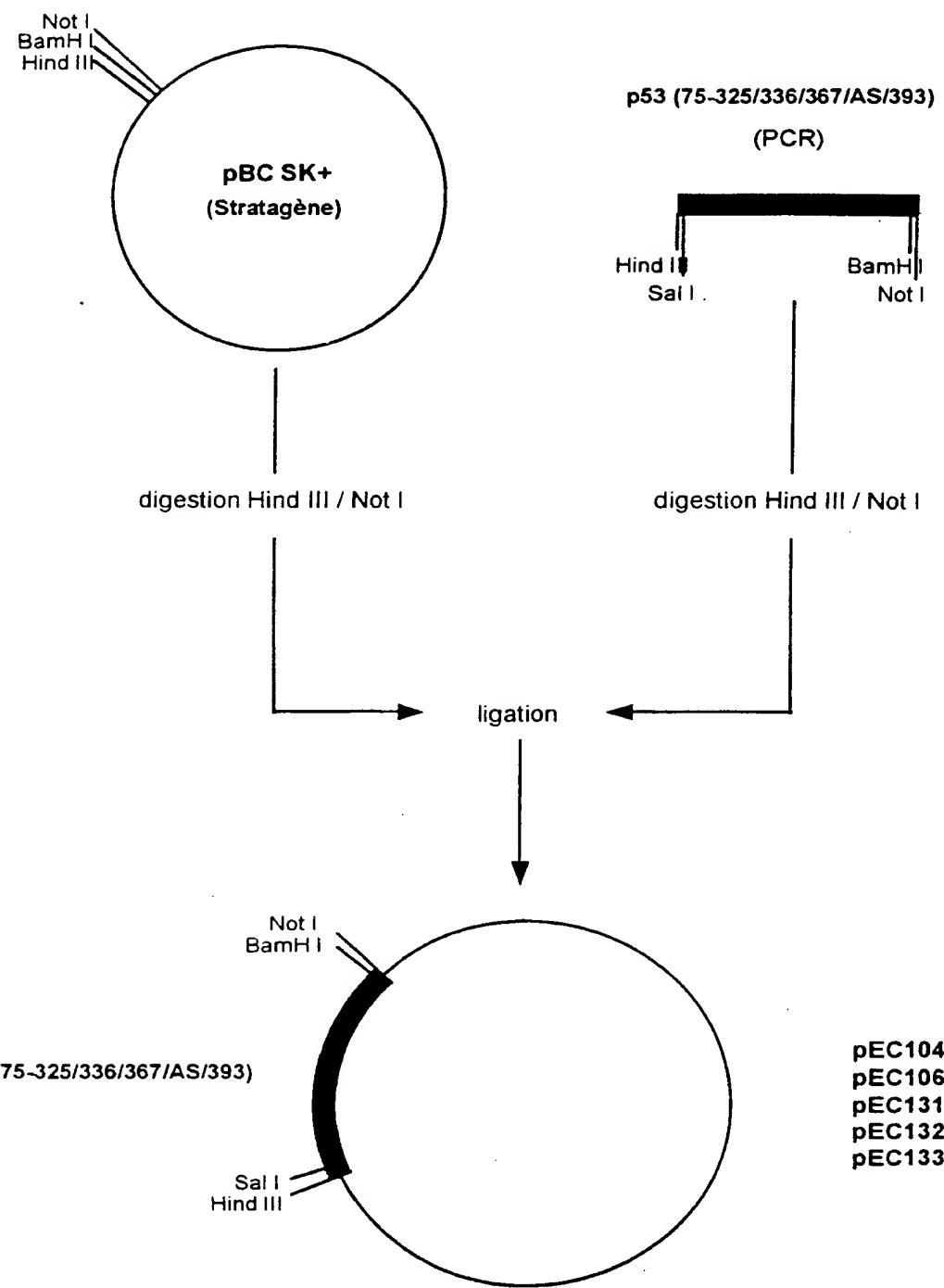


Figure 3

4 / 18

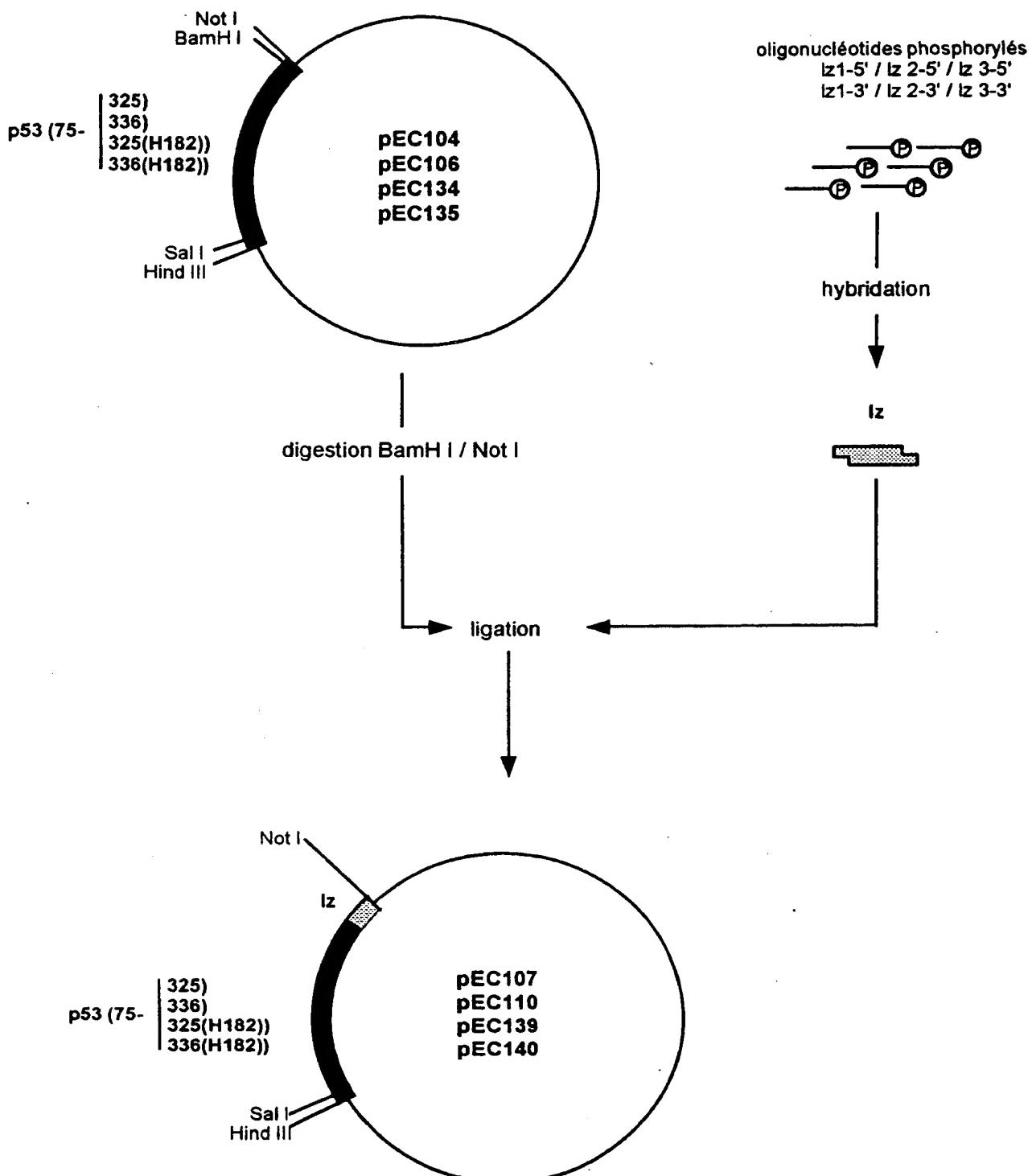


Figure 4

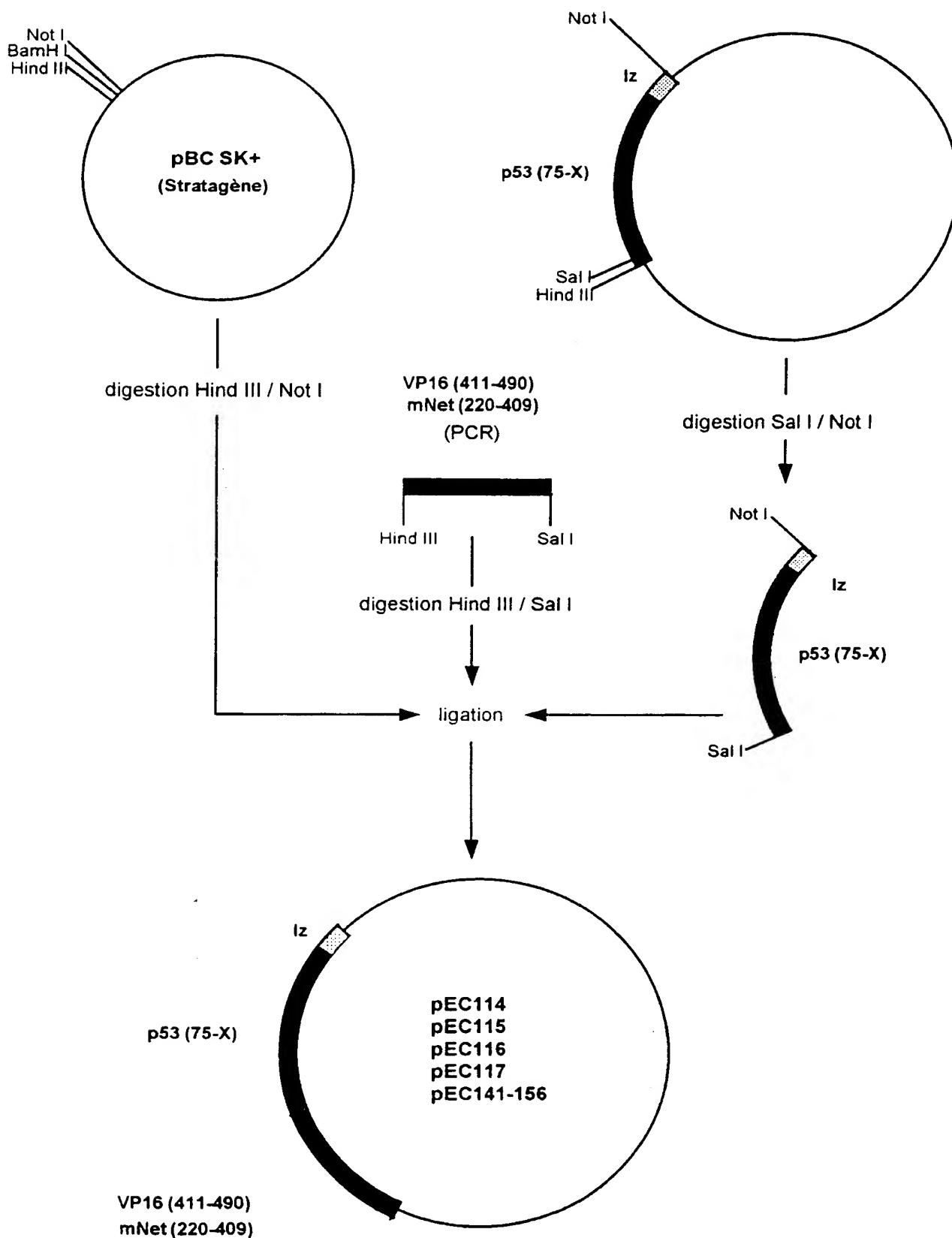


Figure 5

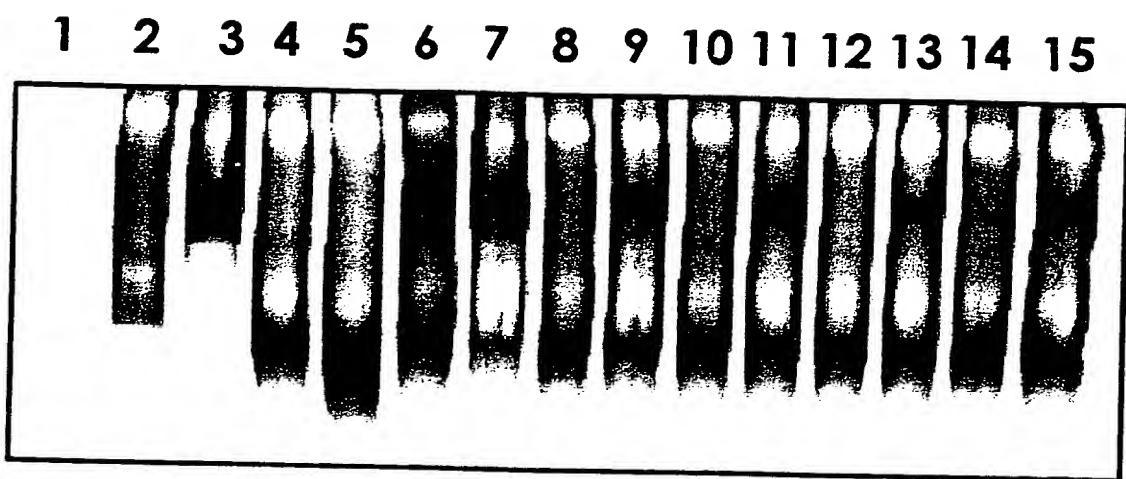


Figure 6

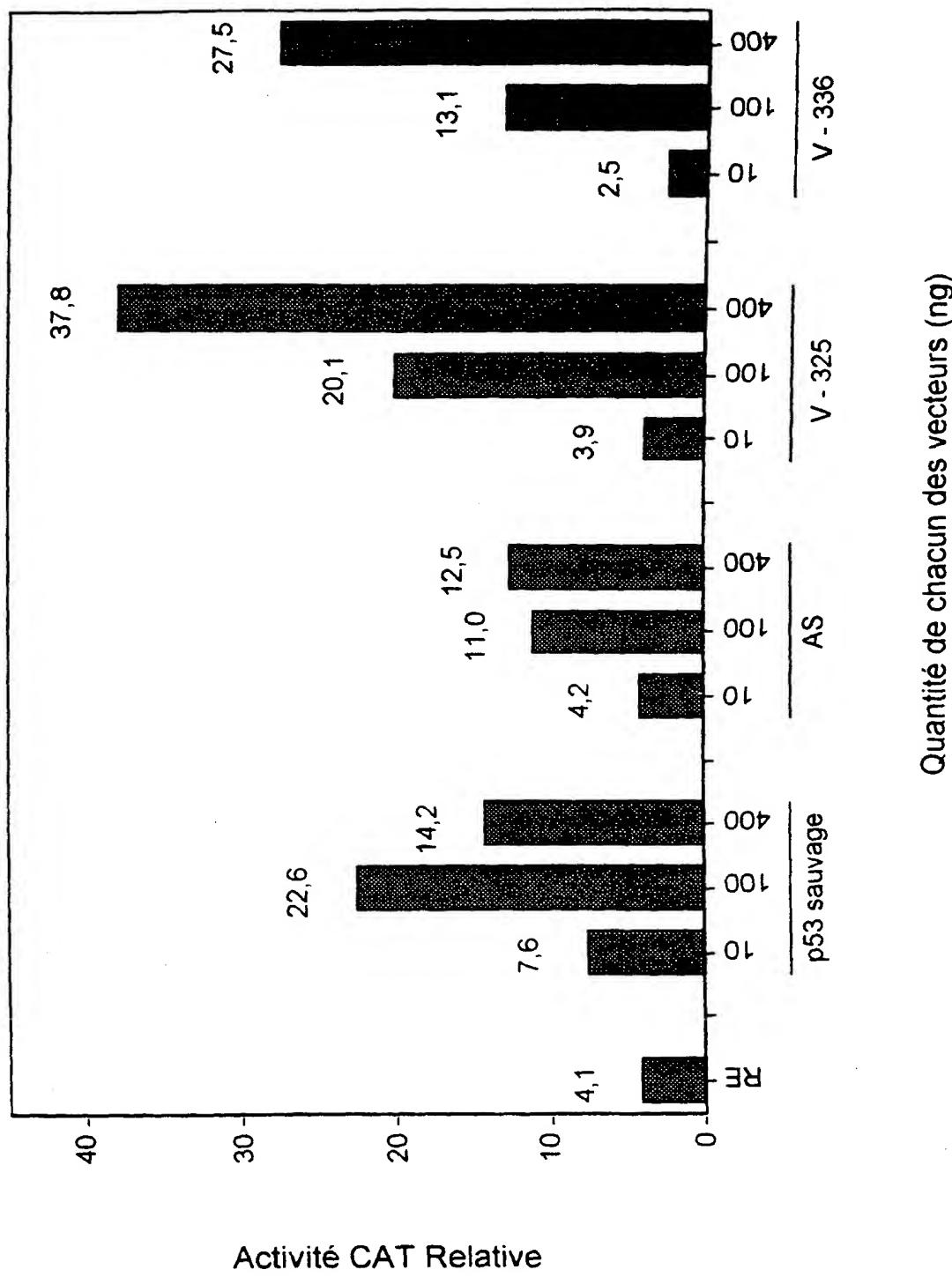


Figure 7

8/18

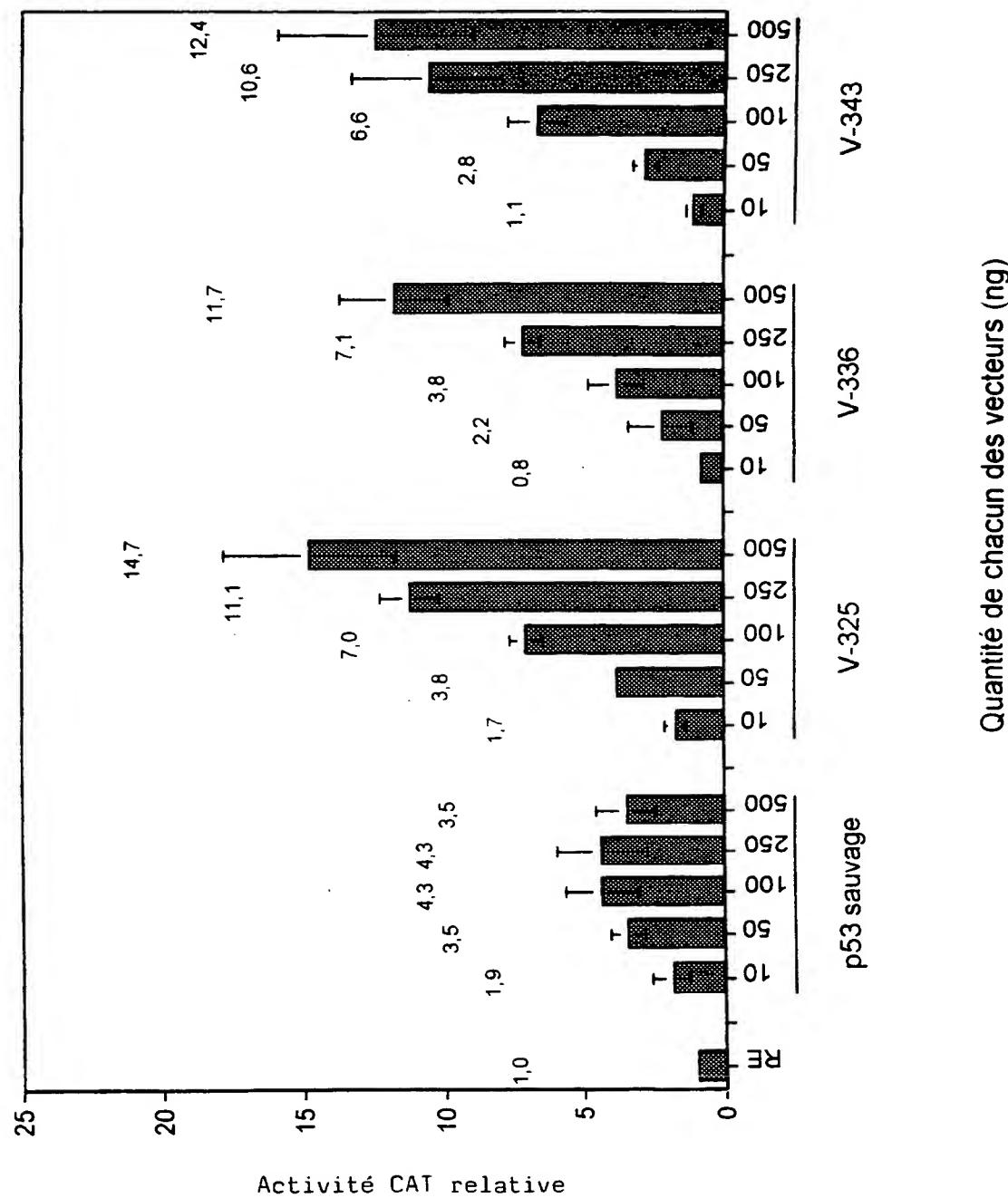


Figure 8

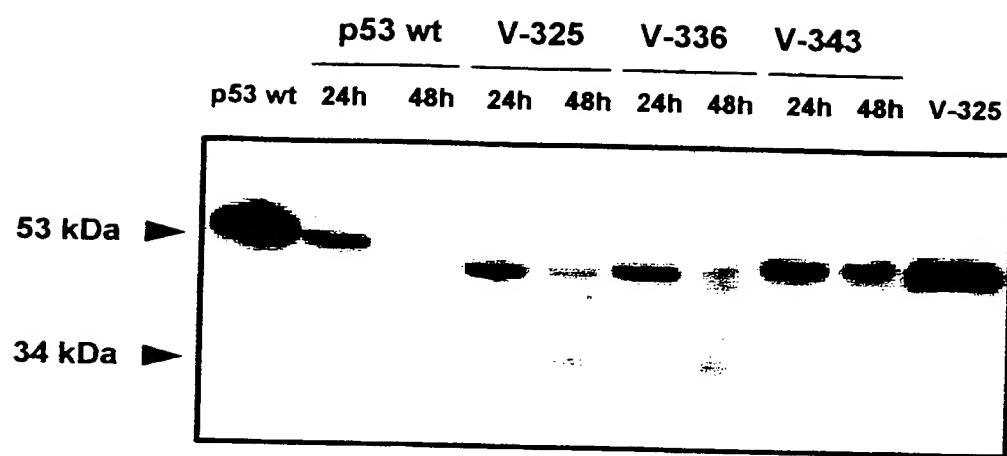


Figure 9

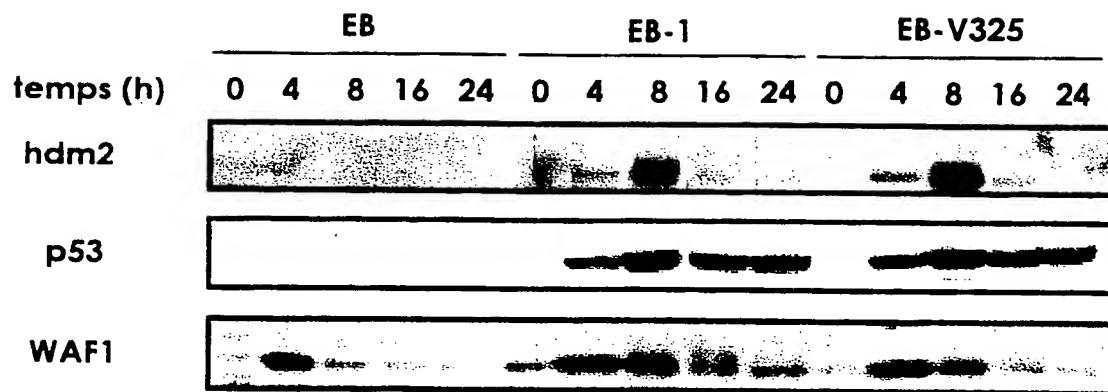


Figure 10

11/18

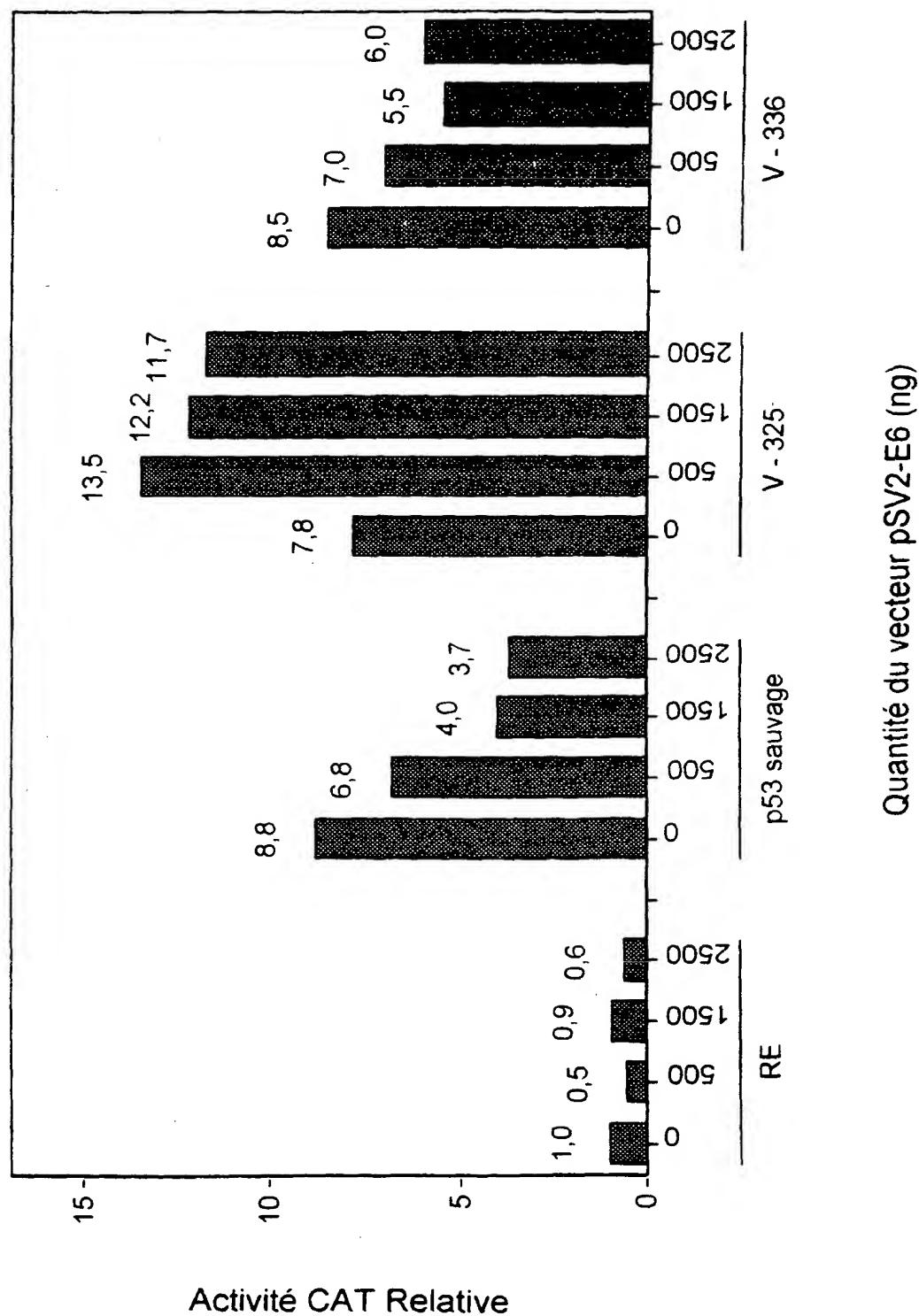


Figure 11

12/18

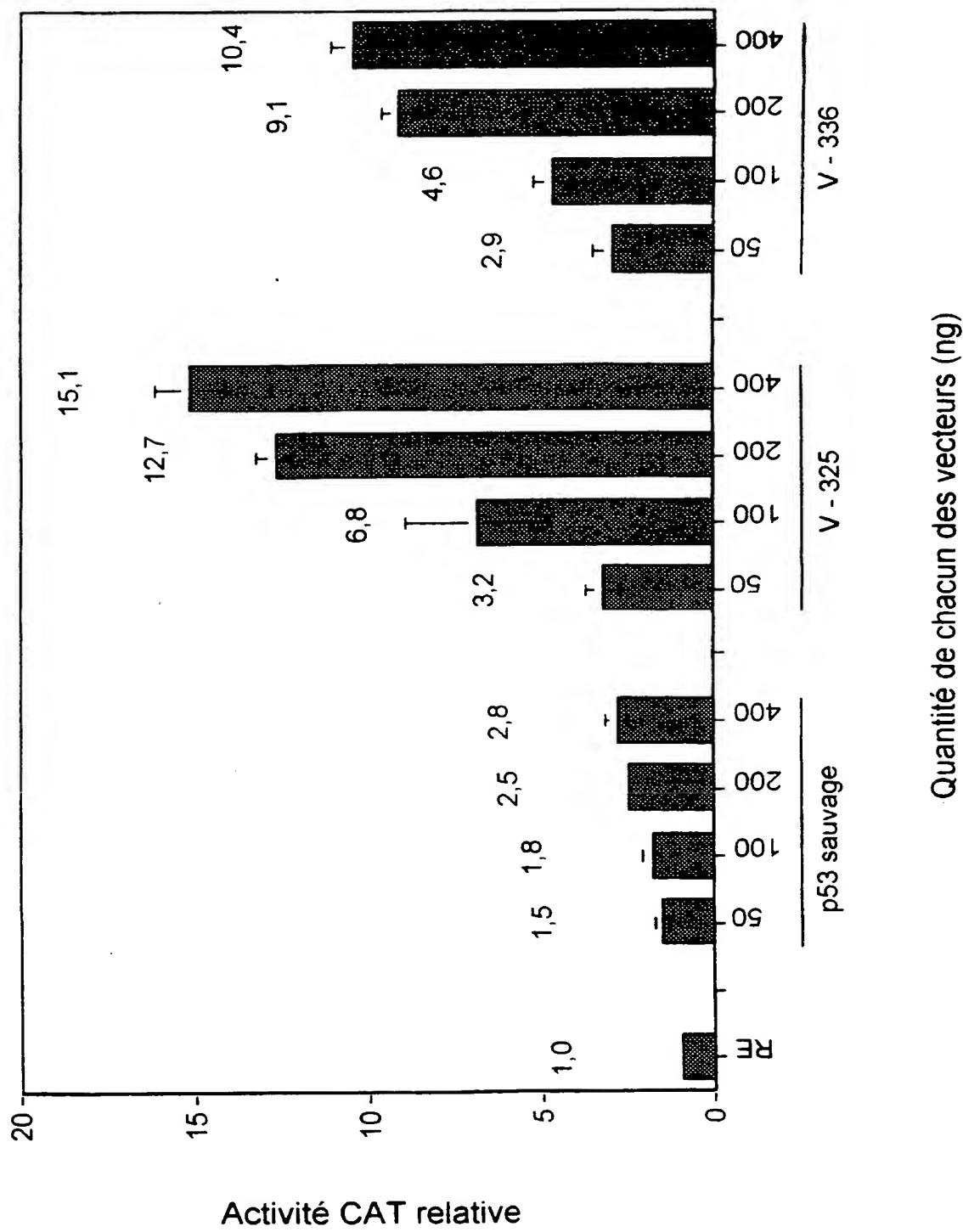
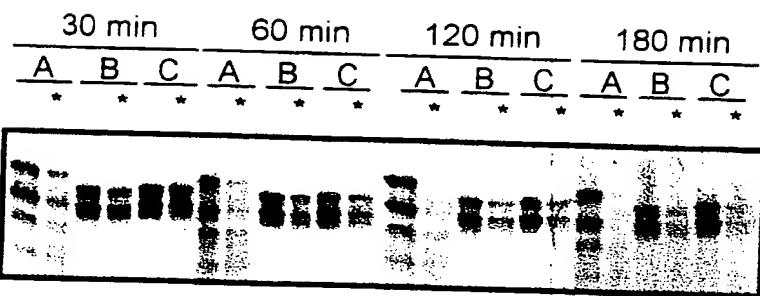
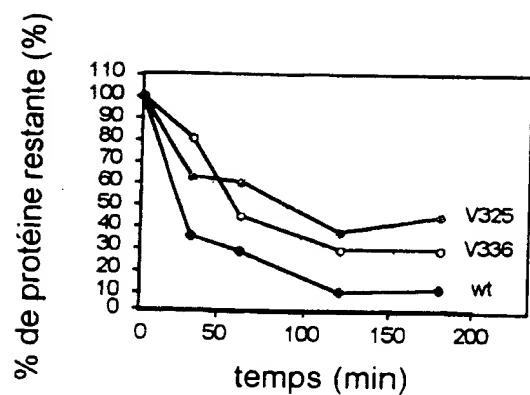


Figure 12

13 / 18



A: p53 sauvage / B: V-325 / C: V-336 / \*: +E6

Figure 13

14/18

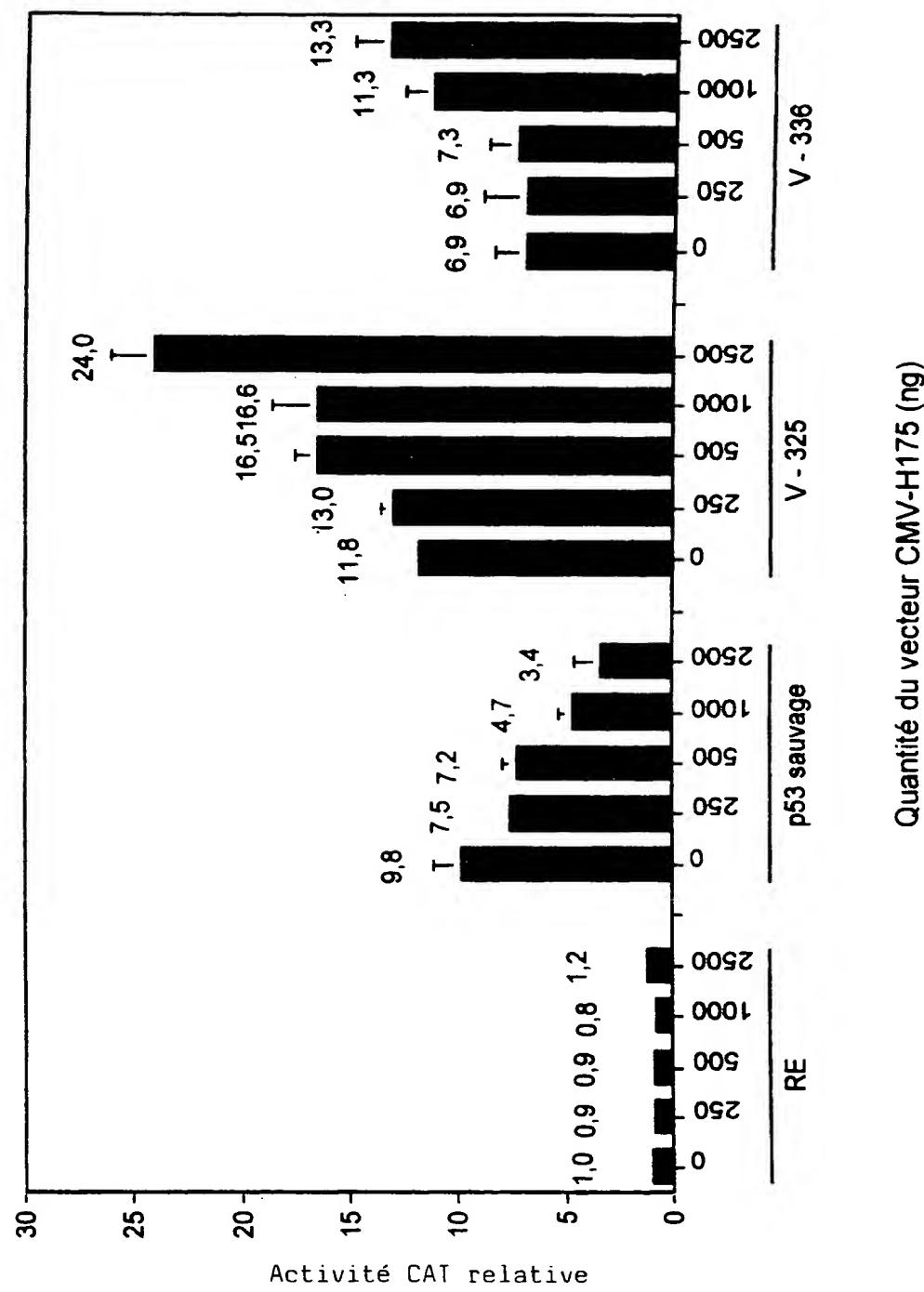


Figure 14

15/18

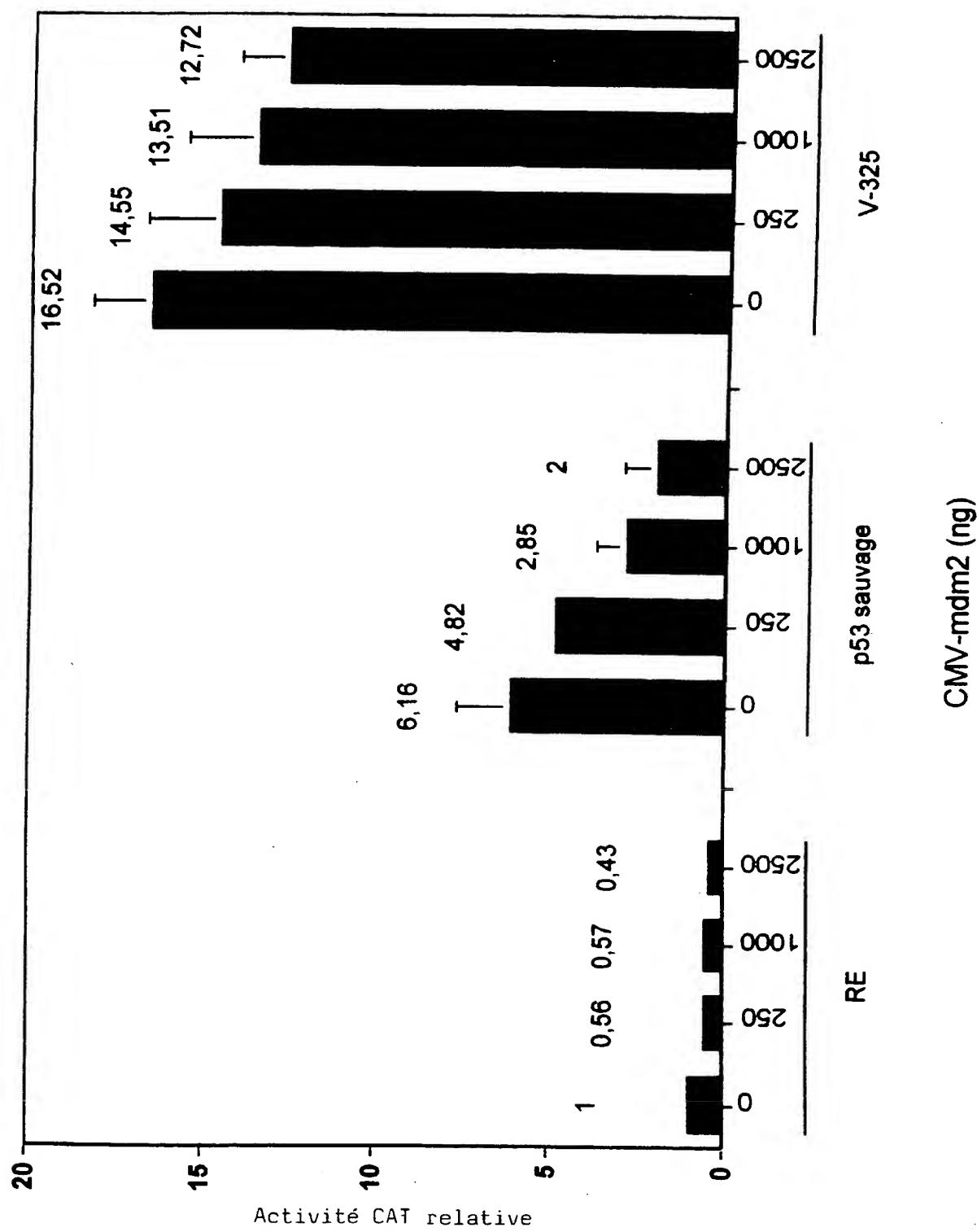


Figure 15

16/18

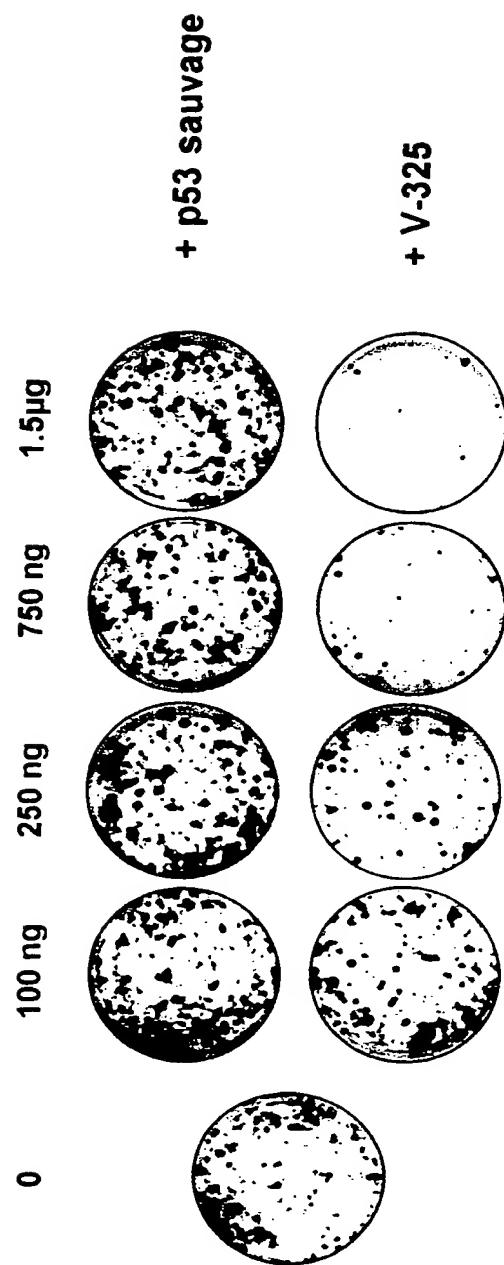


Figure 16

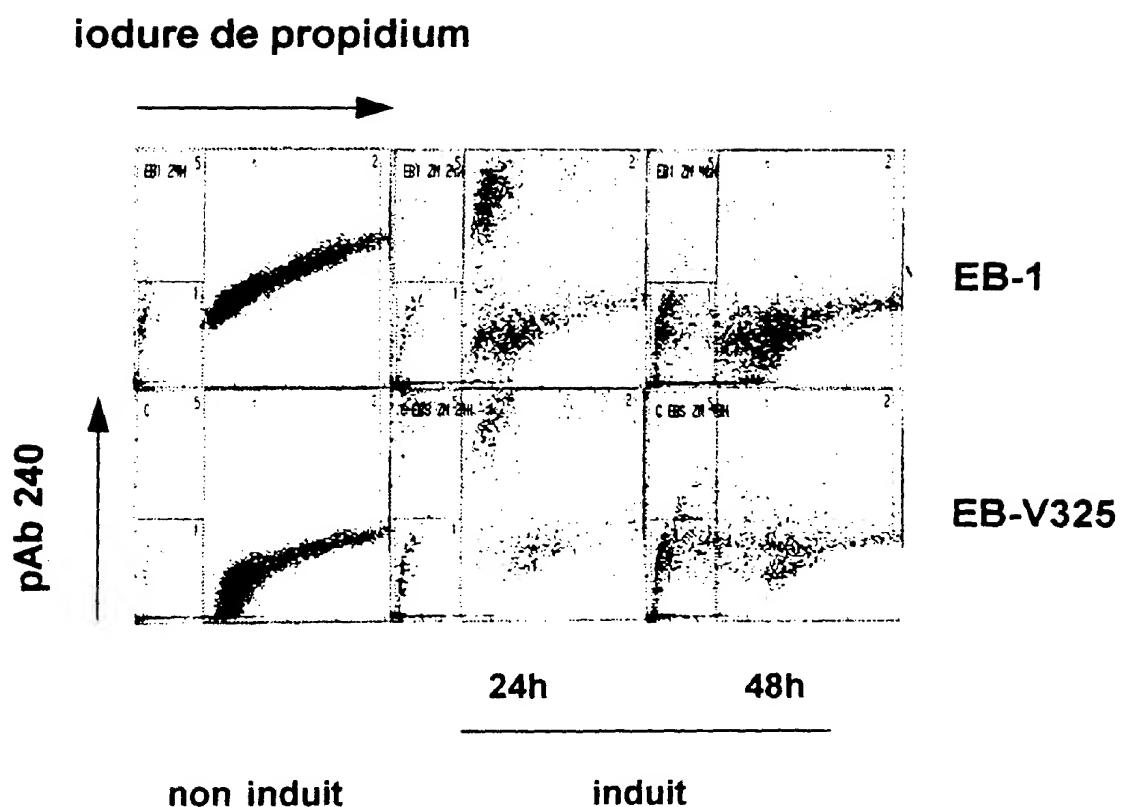


Figure 17

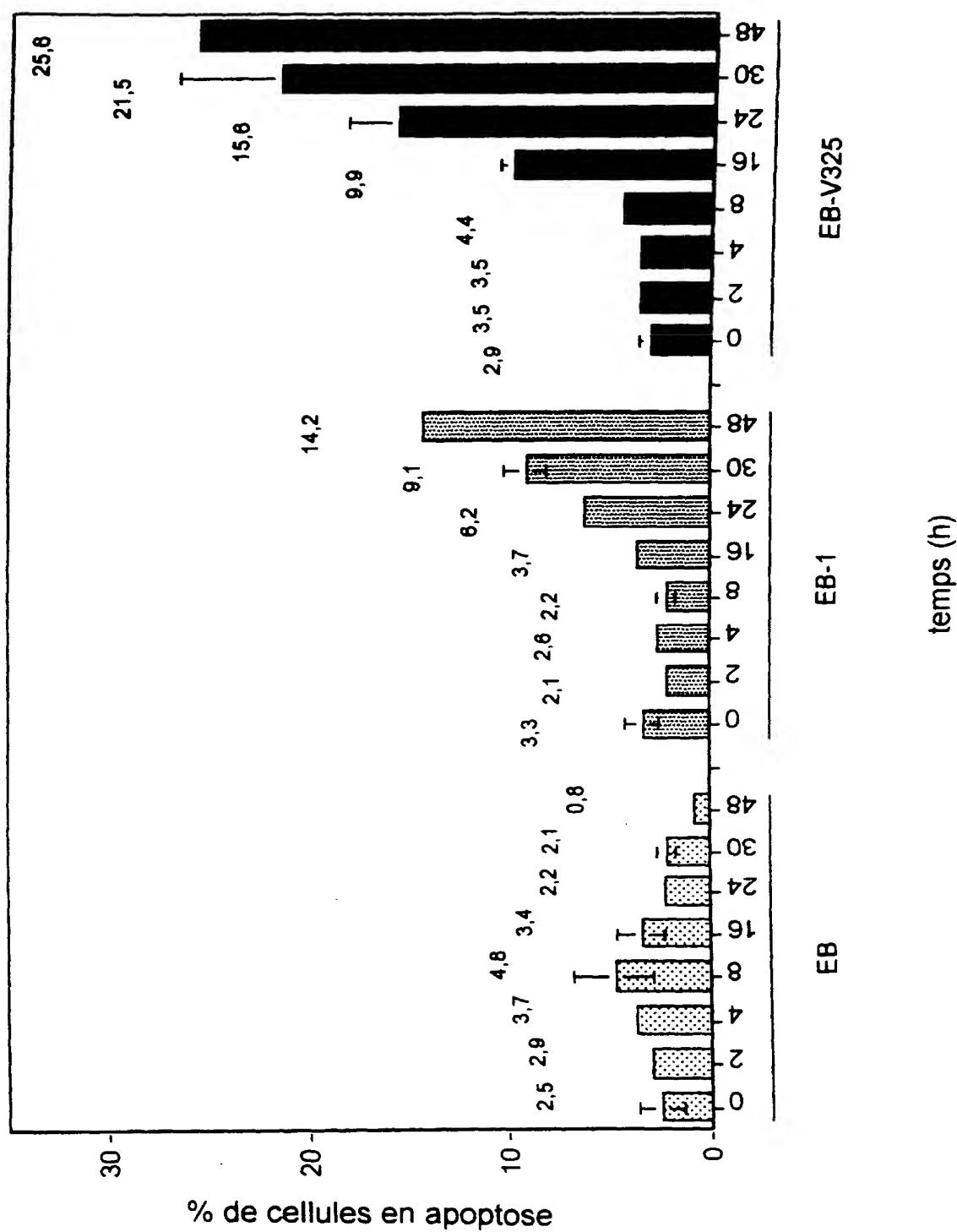


Figure 18

## INTATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01111

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6	C12N15/12	C07K14/82	C12N15/62	C12N15/86	C07K19/00
	A61K38/16	A61K31/70	A61K48/00		

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, WASHINGTON US, pages 1998-2002, XP002019922 PIETENPOL, J. ET AL.: "Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53" cited in the application see the whole document	1-5, 8-15,20, 24,25, 27-29, 40,41, 43,44,50
Y	---	3,21,22, 43-53
		-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 December 1996	11.12.96

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01111

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 11, WASHINGTON US, pages 6849-6857, XP002019923 BROWN, D. ET AL.: "The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein" see figure 2 ---	3
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (1995 JAN) 15 (1) 497-504, XP000568946 WU, L. ET AL.: "Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids." see the whole document ---	21,22
Y	WO,A,95 09916 (RHONE POULENC RORER SA ;MALLET JACQUES (FR); REVAH FREDERIC (FR);) 13 April 1995 see page 4, line 11 - page 5, line 24 ---	43-53
X	GENE EXPRESSION, (1993) 3 (1) 95-107, XP000611818 REED, M. ET AL.: "p53 domains: suppression, transformation, and transactivation." see figure 2 see 'Discussion' ---	24,25,27
A	WO,A,95 17213 (SLOAN KETTERING INST CANCER) 29 June 1995 see the whole document ---	24,25, 27-29, 40-53
A	WO,A,94 12202 (UNIV DUNDEE ;LANE DAVID PHILIP (GB); HUPP THEODORE ROBERT (GB)) 9 June 1994 see page 8, line 23 - page 9, line 5 see claims ---	13-19,53
A	WO,A,95 16771 (PHARMAGENICS INC) 22 June 1995 see page 9, line 4 - line 20 see example 1 ---	3,4, 43-53
P,X 2	EMBO JOURNAL, 15 (14) 3693-701., 15 July 1996, XP002019925 ATTARDI, L. D. ET AL.: "Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis." see figure 1 ---	1,2,5, 8-11, 24-29, 40,41, 43,44
		-/-

## INTATIONAL SEARCH REPORT

ntional Application No  
PCT/FR 96/01111

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,96 16989 (WISTAR INST ;HALAZONETIS THANOS D (US)) 6 June 1996  see page 12, line 4 - page 14, line 10 see page 25, line 17 - page 26, line 27 see page 32, line 9 - page 37, line 6 see claims; figures; examples ---	1,5,8, 10,40, 41,43-53
L	SCIENCE, vol. 250, US, pages 1400-1403, XP002019926 HU, J. ET AL.: "Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions" * Document cité car il met en évidence que le domaine CC de GCN4 utilisé dans PNAS 91,1998-2002 est un leucine zipper * -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/FR 96/01111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9509916	13-04-95	FR-A- 2710846 AU-A- 7816294 CA-A- 2173338 EP-A- 0722496 FI-A- 961494 NO-A- 961220	14-04-95 01-05-95 13-04-95 24-07-96 03-04-96 26-03-96
WO-A-9517213	29-06-95	AU-A- 1440695	10-07-95
WO-A-9412202	09-06-94	AU-A- 5533194 CA-A- 2150265 EP-A- 0675729 JP-T- 8505607	22-06-94 09-06-94 11-10-95 18-06-96
WO-A-9516771	22-06-95	CA-A- 2155930 EP-A- 0682698	22-06-95 22-11-95
WO-A-9616989	06-06-96	US-A- 5573925 AU-A- 4288496	12-11-96 19-06-96

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Brevet de Internationale No  
PCT/FR 96/01111

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 6	C12N15/12	C07K14/82	C12N15/62	C12N15/86	C07K19/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, WASHINGTON US, pages 1998-2002, XP002019922 PIETENPOL, J. ET AL.: "Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53" cité dans la demande voir le document en entier	1-5, 8-15, 20, 24, 25, 27-29, 40, 41, 43, 44, 50
Y	---	3, 21, 22, 43-53
	-/-	

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou citer pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 Décembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11.12.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No  
PCT/FR 96/01111

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 11, WASHINGTON US, pages 6849-6857, XP002019923 BROWN, D. ET AL.: "The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein" voir figure 2 ---	3
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, (1995 JAN) 15 (1) 497-504, XP000568946 WU, L. ET AL.: "Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids." voir le document en entier ---	21,22
Y	WO,A,95 09916 (RHONE POULENC RORER SA ;MALLET JACQUES (FR); REVAH FREDERIC (FR);) 13 Avril 1995 voir page 4, ligne 11 - page 5, ligne 24 ---	43-53
X	GENE EXPRESSION, (1993) 3 (1) 95-107, XP000611818 REED, M. ET AL.: "p53 domains: suppression, transformation, and transactivation." voir figure 2 voir 'Discussion' ---	24,25,27
A	WO,A,95 17213 (SLOAN KETTERING INST CANCER) 29 Juin 1995 voir le document en entier ---	24,25, 27-29, 40-53
A	WO,A,94 12202 (UNIV DUNDEE ;LANE DAVID PHILIP (GB); HUPP THEODORE ROBERT (GB)) 9 Juin 1994 voir page 8, ligne 23 - page 9, ligne 5 voir revendications ---	13-19,53
A	WO,A,95 16771 (PHARMAGENICS INC) 22 Juin 1995 voir page 9, ligne 4 - ligne 20 voir exemple 1 ---	3,4, 43-53
P,X 2	EMBO JOURNAL, 15 (14) 3693-701., 15 Juillet 1996, XP002019925 ATTARDI, L. D. ET AL.: "Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis." voir figure 1 ---	1,2,5, 8-11, 24-29, 40,41, 43,44
		-/-

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de Internationale No  
PCT/FR 96/01111

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	WO,A,96 16989 (WISTAR INST ;HALAZONETIS THANOS D (US)) 6 Juin 1996 voir page 12, ligne 4 - page 14, ligne 10 voir page 25, ligne 17 - page 26, ligne 27 voir page 32, ligne 9 - page 37, ligne 6 voir revendications; figures; exemples ---	1,5,8, 10,40, 41,43-53
L	SCIENCE, vol. 250, US, pages 1400-1403, XP002019926 HU, J. ET AL.: "Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions" * Document cité car il met en évidence que le domaine CC de GCN4 utilisé dans PNAS 91,1998-2002 est un leucine zipper * -----	

2

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs

membres de familles de brevets

de Internationale No

PCT/FR 96/01111

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9509916	13-04-95	FR-A- 2710846 AU-A- 7816294 CA-A- 2173338 EP-A- 0722496 FI-A- 961494 NO-A- 961220	14-04-95 01-05-95 13-04-95 24-07-96 03-04-96 26-03-96
WO-A-9517213	29-06-95	AU-A- 1440695	10-07-95
WO-A-9412202	09-06-94	AU-A- 5533194 CA-A- 2150265 EP-A- 0675729 JP-T- 8505607	22-06-94 09-06-94 11-10-95 18-06-96
WO-A-9516771	22-06-95	CA-A- 2155930 EP-A- 0682698	22-06-95 22-11-95
WO-A-9616989	06-06-96	US-A- 5573925 AU-A- 4288496	12-11-96 19-06-96